



Synthèse sélective de γ -amino acides cyclobutaniques : préparation de nouveaux organogélateurs peptidiques

Hawraà Awada

► To cite this version:

Hawraà Awada. Synthèse sélective de γ -amino acides cyclobutaniques : préparation de nouveaux organogélateurs peptidiques. Chimie organique. Université Paris Sud - Paris XI; Université Libanaise. Faculté des Sciences (Beyrouth, Liban), 2014. Français. NNT : 2014PA112365 . tel-01233344

HAL Id: tel-01233344

<https://theses.hal.science/tel-01233344>

Submitted on 25 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470 :
CHIMIE DE PARIS SUD

Laboratoire : ICMMO
Equipe : CP3A

THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE
par

Hawraà AWADA

*Synthèse sélective de γ -amino acides cyclobutaniques : préparation
de nouveaux organogélateurs peptidiques*

Date de soutenance : 05/12/2014

Composition du jury :

Directeurs de thèse :	David J. AITKEN Ali HACHEM	Professeur (Université Paris-Sud) Professeur (Université Libanaise)
Rapporteurs :	Olivier PIVA Mahmoud FARAJ	Professeur (Université Claude Bernard-Lyon 1) Professeur (Université Libanaise Internationale)
Examineurs :	Daoud NAOUFAL Sami TLAIS Sylvie ROBIN Ogaritte YAZBECK	Professeur (Université Libanaise) Docteur (Université Libanaise Internationale) Maître de conférences (Université Paris-Sud) Assistante de Professeur (Université Libanaise)

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les Professeurs David Aitken et Daoud Naoufal de m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires en France et au Liban pendant cette thèse, et qui m'ont permis de travailler dans d'excellentes conditions.

Pr. Olivier Pivas et Pr. Mahmoud Faraj, m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail en tant que rapporteurs. Pour cela je les remercie. Je tiens à remercier également Pr. Naoufal et Dr. Sami Tlais d'avoir accepté de résider au sein de mon jury de thèse.

J'aimerais exprimer mes sincères remerciements et ma profonde gratitude aux Pr. David Aitken et Dr. Sylvie Robin en France, et Pr. Ali Hachem et Dr. Ogaritte Yazbeck au Liban. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée durant ces trois années de thèses, vos conseils, votre encadrement et votre disponibilité. Je tiens à remercier particulièrement David pour son grand soutien et son excellente formation scientifique qui m'ont été si précieux, et à Sylvie qui m'a solidement encadrée et à qui je suis extrêmement reconnaissante.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers Dr. Nada Jaber pour son encouragement dans les moments les plus difficiles, son soutien moral et sa compréhension.

Il m'est impossible d'oublier Jean-Pierre Baltaze avec lequel j'ai échangé des discussions et moments enrichissants, aussi pour sa gentillesse infinie, sa patience et sa belle humeur. A ce titre, je remercie également Philippe Berdaquet pour son sourire qui me faisait oublier mes soucis.

Au cours de ces années, j'ai fait partie de deux équipes : le LSOM Français (ou CP3A récemment) et le LCIO Libanais, et dans lesquels j'ai reconnu une ambiance chaleureuse. Je remercie tous les membres de laboratoire que j'ai pu rencontrer : Virginie pour sa grande gentillesse, Nicolas, Thomas et Ricardo pour leur sens de l'humour et leur support, Florence pour ses conseils de sécurité innombrables, un grand merci à Jean, Antoine, Isabelle, Sandrine et surtout Valérie pour sa grande gentillesse !

Je remercie particulièrement mes amis de laboratoire, avec qui j'ai passé les moments les plus agréables : Florian, le plus grand musicien et chanteur à l'ICMMO, Pauline (et sa nicotine à la menthe) qui me faisait rire à fond, Rémi (mon fournisseur de crayons mine) et sa mignonne fille Léa, France qui me rendra visite au Liban un jour pour manger du Hommos. J'ai réservé le plus grand merci à ma collègue, ma sœur

et meilleure amie Claire Grison. Merci Claire pour ton amitié, pour les moments « ouf » qu'on a passés ensemble, pour tes encouragements durant les moments les plus durs ! Tu resteras pour moi une personne exceptionnelle à tous les niveaux ! Je remercie aussi Zahra, Alaa, Suzane, Amani, Nancy, Fatima, Rossella, Gloria, Blandine, Sandra, Minh Thao, et Vincent. Je suis très contente de vous connaître tous !

J'adresse mes plus sincères remerciements à mes amis libanais qui ont facilité la vie loin du pays et de la famille, et avec qui j'ai passé les moments les plus agréables. Merci Kamar et Nada, pour les moments magnifiques passés ensemble, Hiba et Fatima pour les plus belles sorties dans les quartiers de Paris et les restaurants turques et hindis, Georges, Ahmad, Houssein, Ammar, Ali, Ghayas et Farah.

Un merci de tout mon coeur à ma belle famille au complet et à mon fiancé Zakaria, mes amies (Liliana, Ghina, Samar, et Sarah) qui ont tous cru en moi, pour leur amour, leur soutien permanent, leurs encouragements et leur patience d'être loin d'eux.

Enfin, j'aimerais dédier ce manuscrit à la mémoire de mon beau-père Mohamad-Houssein Alamiddine, enseignant en chimie, et son fils Ali, martyrisés durant la dernière guerre au Liban, dont je n'ai pas eu la chance de connaître en personne, pourtant leur amour est ressenti de là-haut.

Résumé

L'acide γ -aminobutyrique ou GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur présent dans le système nerveux central (CNS). Afin d'obtenir un nouveau dérivé cyclobutanique du GABA, le *cis*-^{3,4}CB-GABA, sous forme énantiomériquement pure, deux stratégies de synthèses efficaces et reproductibles ont été mises au point. Ces deux voies de synthèse impliquent toutes les deux une étape-clé de photocycloaddition [2+2] qui permet de créer le cycle à 4 chaînons. La première consiste en une homologation de l'acide *cis*-2-aminocyclobutanique (*cis*-ACBC), et la deuxième est une synthèse multi-étape qui utilise le caprolactame comme composé de départ.

D'autre part, grâce à une synthèse stéréosélective du (1*R*,2*S*)-*cis*-^{2,3}CB-GABA, quelques oligomères C- et N-protégés – di, tri, et tétra-peptides – de cet aminoacide ont été préparés. Ceux-ci ont été caractérisés par les techniques de RMN 1D et 2D, IR, RX. Les analyses ont montré qu'il n'existe pas d'interactions non-covalentes (liaisons hydrogène) inter-résidu au sein de ces structures moléculaires. En revanche, la propriété de gélification de ces oligomères dans différents solvants organiques a été mise en évidence. Des solutions et des gels formés à partir de ces peptides ont été analysés par microscope électronique à balayage et des clichés ont été obtenus montrant une organisation du di- tri- et tetrapeptide en fibrilles.

Mots-Clés : GABA analogue, aminoacide, méthode de synthèse, photocycloaddition, désoublement racémique, couplage peptidique, oligomère, auto-assemblage.

Abstract

The γ -aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS). In order to obtain new enantiomerically pure cyclobutanic derivative of GABA, the *cis*-^{3,4}CB-GABA, two efficient synthetic strategies have been established. Both synthetic routes employed a photocycloaddition [2 +2] protocol, which provided the cyclobutanic ring. The first route involved the homoligation of the *cis*-2-aminocyclobutanecarboxylic acid (*cis*-ACBC), whereas the second route is a multi-step synthesis using caprolactam as starting material.

On the other hand, the (1*R*,2*S*)-*cis*-^{2,3}CB-GABA was synthesized, and a series of *N*- and *C*-protected oligomers of di, tri, and tetrapeptides of this amino acid were prepared. These oligomers were characterized by NMR (1D and 2D) techniques, IR, and X-ray. The analyses have shown that there are no non-covalent interactions (hydrogen bonds) between the residues of each oligomers. However, the gelation property of these oligomers in various organic solvents was demonstrated. Solutions and gels formed from these peptides were analyzed by scanning electron microscopy, and the obtained images showed a fibrous organization of the di- tri- and tetrapeptide.

Keywords: GABA analogue, amino acids, synthetic methods, photocycloaddition, chiral resolution, peptide coupling, oligomer, self-assembly.

Tables des matières

<i>Table des figures</i>	15
<i>Introduction</i>	23
I- Les γ-aminoacides : Généralités et définitions	23
A- Le GABA et ses analogues	23
a- Définition et importance biologique	23
b- Les analogues du GABA.....	25
II- Les γ-aminoacides dans les peptides	45
A- Les peptides naturels	45
B- Les peptides non-naturels	47
C- Conclusion du chapitre	57
<i>Présentation des travaux</i>	59
<i>Résultats et discussion</i>	61
III- Synthèse du <i>cis</i>-^{3,4}CB-GABA (\pm)-115 énantio pure	61
A- Synthèse du (\pm)-Boc-<i>cis</i>-^{3,4}CB-GABA (\pm)-139 par homologation du (\pm)-Boc-<i>cis</i>-ACBC	61
a- Synthèse du (\pm)-Boc- <i>cis</i> -ACBC, (\pm)-119	61
b- Homologation du (\pm)-Boc- <i>cis</i> -ACBC, (\pm)-119.....	65
B- Deuxième stratégie de synthèse en série racémique : à partir du caprolactame..	75
a- Présentation de la stratégie.....	75
b- Synthèse du (\pm)-Boc- <i>cis</i> - ^{3,4} CB-GABA, (\pm)-139	76
c- Comparaison des deux stratégies	78
C- Dédoublément du (\pm)-Boc-<i>cis</i>-^{3,4}CB-GABA (\pm)-139	78
a- Couplage avec les alcools chiraux	79
b- Couplage avec la (-)-4-méthyl-5-phényl-2-oxazolidinone.....	80

c-	Clivage de la copule chirale et formation des zwitterions	81
IV-	Synthèse de γ-peptides de <i>cis</i>-^{2,3}CB-GABA	85
A-	Synthèse du (-)- <i>cis</i> -Boc- ^{2,3} CB-GABA.....	85
V-	Synthèse d'oligomères de <i>cis</i>-^{2,3}CB-GABA.....	87
A-	Synthèse des blocs de construction	88
B-	Synthèse des dipeptides (-)-170 et (-)-171	88
C-	Synthèse du tripeptide (-)-173	90
D-	Synthèse des tétrapeptides 177 et (-)-178	91
E-	Synthèse de l'hexamère 180	92
VI-	Analyses conformationnelles des oligomères	94
A-	Analyse par diffraction des Rayons-X	94
B-	Etude par RMN.....	97
a-	Le dipeptide (-)-170.....	98
b-	Le dipeptide (-)-171.....	101
c-	Le tétrapeptide (-)-178.....	104
C-	Etude par dichroïsme circulaire	105
D-	Etude par IR.....	110
VII-	Les Gels.....	114
A-	Définition et types de gels :.....	114
B-	Formation d'un gel et ses applications.....	115
a-	Application en chimie médicinale et médecine régénérative.....	116
b-	Application en catalyse	118
C-	LMWGs peptidomimétiques.....	119
a-	Les α - et les β -aminoacides dans les LMWG	119
b-	Les γ -aminoacides dans les LMWG	123
VIII-	Etudes des propriétés de gelation des peptides synthétisés	127

A- Procédure de gélification et test d'inversion.....	127
a- Test de thermo-réversibilité	130
B- Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB).....	130
<i>Conclusion</i>	<i>134</i>
<i>Experimental Section</i>	<i>136</i>
<i>References</i>.....	<i>210</i>

Table des figures

Figure 1 : Exemples d' α - β - et γ -aminoacides.	23
Figure 2 : L'acide γ -aminobutyrique – GABA.	24
Figure 3 : La régulation de la concentration du GABA dans le cerveau.	24
Figure 4 : Quelques dérivés du GABA.	25
Figure 5 : Quelques analogues rigidifiés du GABA.	26
Figure 6 : Analogues acycliques du GABA.	26
Figure 7 : Analogues cycliques du GABA.	29
Figure 8 : Des analogues cycliques du GABA à 3 chaînons.	32
Figure 9 : Poly- γ -acide- <i>D</i> -Glutamique.	45
Figure 10 : Imadicines A-E (1a-e) contenant un γ -aminoacide (γ Abu). ⁶²	45
Figure 11 : Les unguisines A-C contenant le GABA.	46
Figure 12 : Cyclothéonamides A-E contenant un γ -aminoacide substitué.	46
Figure 13 : Microsclérodermines A et B contenant un β -hydroxy- γ -aminoacide.	47
Figure 14 : Deux γ -peptides A et B (parmi d'autres) testés pour leur stabilité envers les enzymes protéolytiques.	48
Figure 15 : Les différents angles de torsion dans un peptide.	48
Figure 16 : Les γ -peptides ayant une affinité envers les récepteurs de la Somatostatine.	49
Figure 17 : Des $\gamma^{2,4}$ - peptides (α,S)- et (α,R)-méthylés.	50
Figure 18 : Structuration en hélice-9 pour un γ^4 -peptide. Les liaisons hydrogène sont indiquées en bleu.	50
Figure 19 : Structure RX de a) Boc-Gpn-Gpn-NHMe et b) Boc-Gpn-Gpn-Gpn-Gpn-NHMe ; les liaisons hydrogène intramoléculaires sont représentées par des pointillés. ⁸⁰	51
Figure 20 : Influence d'un cycle sur les angles de torsion d'un γ -aminoacide.	51
Figure 21 : Un homo-oligomère à base de $\gamma^{3,4}$ -aminoacides cyclohexaniques et les liaisons hydrogène (en rouge) impliquant la formation d'hélice-14, et celle formant un pseudo-cycle en C-9.	52
Figure 22 : Structures en épingle des oligomères du <i>trans</i> -3-ACPC.	52
Figure 23 : Structuration en ruban C-9 des γ -peptides de N ^{α} -acétyl cis- γ -amino-L-proline.	53
Figure 24 : γ -peptides à base de 2,3- <i>trans</i> -dioxalane structurés en ruban.	53

Figure 25 : a) γ -dipeptides à base de β -hydroxy γ -azido esters ; b) conformation du dimère à l'état solide par diffraction au rayon-X ; c) structuration en coude du dimère. ⁸⁵	54
Figure 26 : Dérivés cyclobutanique de γ -aminoacides A et B , γ,γ -peptides hybrides C et D . Les liaisons hydrogène sont montrées en bleu.	54
Figure 27 : Image en MET des vésicules formées par les tetrapeptides C i) et D ii) dans des solutions à 2 mM dans du MeOH. ⁸⁷	55
Figure 28 : γ,γ -Peptides hybrides marqués par du CF ; première génération (A) et quelques peptides de la deuxième génération (B) ayant les plus grandes capacités de pénétration dans les cellules. 55	
Figure 29 : Structurations en feuillets parallèles pour un tripeptide issu du <i>trans</i> - γ - aminoacides cyclopropaniques. Les liaisons hydrogène sont montrées en bleu.	56
Figure 30 : β -turn stabilisant la structuration en feuillets de l'oligomère du <i>trans</i> - γ -aminoacides cyclopropaniques. Les liaisons hydrogène sont montrées en bleu. Le linker est montré est rouge.	57
Figure 31 : Dérivés cyclobutaniques du GABA.....	59
Figure 32 : Oligomères du (+)- 57	60
Figure 33 : Diagramme énergétique montrant les états excités singulet et triplet.....	62
Figure 34 : Schéma d'un réacteur photochimique (droite) ; photo d'un réacteur photochimique en pyrex (ou quartz) avec une lampe UV allumée (gauche).	64
Figure 35 : Les copules chirales utilisées pour le dédoublement du (\pm)- <i>cis</i> -Boc ^{3,4} CB-GABA-(\pm)- 139	79
Figure 36 : Structure d'un monocristal du composé (+)- 166b par diffraction aux rayons-X.	81
Figure 37 : Chromatogrammes des composés (\pm)- 139 , (-)- 139 et (+)- 139 montrant le temps de rétention de chaque énantiomère ainsi que son ee.	82
Figure 38 : Chromatogramme du mélange d'énantiomères (\pm)- 139	83
Figure 39 : Chromatogramme du composé (-)- 139	83
Figure 40 : Chromatogramme du composé (+)- 139	84
Figure 41 : Structure du monocristal de l'aminoester <i>N</i> -Boc (-)- 168 . L'angles ζ montré en vert est égale à -24,58°.	95
Figure 42 : Formation de liaisons intermoléculaires (en bleu) pour l'aminester <i>N</i> -Boc (-)- 168 . .95	
Figure 43 : Structures des monocristaux des dipeptides (-)- 170 (haut) et (-)- 171 (bas) par diffraction aux rayons X. Les angles ζ sont montrés en vert.....	96
Figure 44 : Arrangement des molécules du dipeptide (-)- 170 en feuillets antiparallèles (liaisons hydrogène en bleu égales à 1.9 Å).	97

Figure 45 : Arrangement des molécules du dipeptide (–)- 171 en feuillets antiparallèles (liaisons hydrogène en bleu égales à 1.9 et 2.0 Å).....	97
Figure 46 : Spectre RMN ^1H à 400 MHz du dipeptide (–)- 170 dans le CDCl_3	98
Figure 47 : Spectres TOCSY (en bleu et en vert) à 400 MHz du dipeptide (–)- 170 montrant les couplages scalaires dans chacun des blocs du dipeptide. En rouge, le spectre de ^1H du dipeptide (–)- 170	99
Figure 48 : Spectre HMBC à 400 MHz du dipeptide (–)- 170	100
Figure 49 : Variation isotopique des NH du dipeptide (–)- 170 par ajout de CD_3OD	101
Figure 50 : Spectre RMN ^1H à 400 MHz du dipeptide (–)- 171 dans le C_6D_6	102
Figure 51 : Spectres TOCSY (en bleu et en vert) à 300 MHz du dipeptide (–)- 171 montrant les couplages scalaires dans chacun des blocs du dipeptide. En rouge, le spectre de ^1H du dipeptide (–)- 171	102
Figure 52 : Spectre HMBC à 400 MHz du dipeptide (–)- 171	103
Figure 53 : Variation isotopique des NH du dipeptide (–)- 171 par ajout de CD_3OD	104
Figure 54 : Spectre de ^1H à 400 MHz du tétrapeptide (–)- 178 dans le CDCl_3	105
Figure 55 : <i>trans</i> - β -peptides cyclobutaniques ; spectre de CD dans le MeOH (0,2 mM) du dimère 181 , tetramère 182 , hexamère 183 et de l'octamère 184 . ¹²⁹	107
Figure 56 : Hétéropeptides à base d'acides aminés cyclobutaniques ; spectre de CD dans le MeOH (0,5 mM) de ces oligomères. ¹³⁰	108
Figure 57 : β -peptides cyclobutaniques (gauche) ; spectre de CD à l'état solide (30 mM dans le KBr) des tétrapeptides 185 , 186 , 187 et 193 . ¹³⁸	108
Figure 58 : Spectre de CD des peptides (–)- 171 , (–)- 173 et (–)- 178 (0,2 mM dans l'acétonitrile).	109
Figure 59 : Spectre IR du dipeptide (–)- 170 en solution dans CHCl_3	111
Figure 60 : Spectre IR du dipeptide (–)- 171 en solution dans CHCl_3	112
Figure 61 : Spectre IR du tétrapeptide (–)- 178 en solution dans CHCl_3	113
Figure 62 : Images par SEM du collagène (gauche) et de l'Agarose (droite). ^{143,144}	114
Figure 63 : Les structurations primaires, secondaires et tertiaires d'un gel macroscopique auto-assemblé. ¹⁴⁸	116
Figure 64 : Image par microscopie à contraste de phase : structure membranaire formée à partir de l'EAK16. ¹⁵⁴	117
Figure 65 : Image par microscopie électronique de 2,4 mg/mL du RAD16-I (en haut) ; séquence d'acides aminés du RAD16-I (en bas). ¹⁵⁵	117

Figure 66 : Peptide catalyseur de l'hydrolyse du DNPA.	119
Figure 67 : Pseudo-peptides 196 et 197	119
Figure 68 : Structure chimique de l'organogel.	120
Figure 69 : Images de MEB de l'organogel dans le toluène (a) et dans le <i>n</i> -octanol (b). ¹⁶²	120
Figure 70 : Images MEB de l'évolution de l'organogel sous irradiation UV. ¹⁶²	121
Figure 71 : Images en MET des structures secondaires de a) <i>cis</i> -(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-ACPC ₅ 198 (fibrilles à 1 mM dans l'eau), et b) <i>trans</i> -(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-ACHC ₄ 199 (vésicules à 1 mM dans le MeOH). ¹⁶³	121
Figure 72 : Des β -peptides cyclobutaniques 200-204 . Les liaisons hydrogène sont montrés en bleu.	123
Figure 73 : i) Image MET des fibrilles formées dans des solutions à 1 mM du tetrapeptide 200-a dans le MeOH ; ii) et iii) images MEB du xérogel des peptides 203 et 204 respectivement. ¹⁶⁵ ..	123
Figure 74 : Structures des α,γ,α -peptides 205 et 206 avec des liaisons hydrogène formant un pseudo-cycle en C ₉ (bleu) ou en C ₇ (rouge).	123
Figure 75 : L'image de MEB des fibrilles obtenues par le tripeptide 205 . ¹³¹	124
Figure 76 : Hétéropeptides à base d'acides aminés cyclobutaniques 185 , 186 , 187 et 193	124
Figure 77 : Images MEB des tétrapeptides 207 (a), 208 (b), 209 (c) et 210 (d). ¹³⁸	125
Figure 78 : Homo-oligomères à base d'Aib.	125
Figure 79 : Images AFM de 211 (a) et 212 (b) dans le toluène. Images en MEB de 211 (c) dans 95 % de DMSO dans l'eau) et (d) dans le toluène. Images MEB de 212 dans le MeOH (e) et dans le toluène (f). ¹⁶⁶	126
Figure 80 : Test d'inversion effectué sur des gels obtenus avec le dipeptide (–)- 171 : A (cyclohexane) et B (huile d'olive) ; le tripeptides (–)- 173 : C (toluène), D (1,2-dichloroéthane), E (dichlorométhane), F (acétate d'éthyle), G (acétonitrile) et H (huile d'olive) ; et de tétrapeptides (–)- 178 : I (toluène), J (chloroforme), K (1,2-dichloroéthane) et L (dichlorométhane).	129
Figure 81 : Images de MEB des xérogels du a) dipeptide (–)- 171 dans le cyclohexane, b, c et d) tripeptide (–)- 173 dans le toluène, le 1,2-dichloroéthane et l'acétonitrile respectivement, e et f) du tétrapeptide (–)- 178 dans le toluène et le 1,2-dichloroéthane respectivement.	131
Figure 82 : Images de MEB des solutions du a) dipeptide (–)- 171 et du b) tétrapeptide (–)- 178 , dans du chloroforme à 40 mM.	132

Abréviations

A-KG	α -cétoglutarate	DLS	diffusion dynamique de la lumière
Ac₂O	anhydride acétique	DMAP	diméthylaminopyridine
ACBC	β -aminoacide cyclobutanique	DME	Diméthoxyéthane
Ach	aminocyclohexanique	DMF	diméthylformamide
ACHC	acide -2-aminocyclohexanique	DMSO	diméthyl sulfoxyde
ACPC	aminoacide cyclopentanique	DNPA	2,4-dinitrophényl acétate
AFM	atomic force microscopy	ECM	matrice extracellulaire
Ala	alanine	EDCI.HCl	chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
Arg	arginine	ee	excès énantiomérique
Asp	acide aspartique	Et₃N	triéthylamine
ATR	réflexion totale atténuée	GABA	acide γ -aminobutyrique
Boc₂O	dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle	GABA-AT	GABA aminotransférase
Bu₄NI	iodure de tétrabutylammonium	GABOB	β -hydroxy- γ -aminoacide
CACA	acide <i>cis</i> -4-amiocrotonique	GAD	acide <i>L</i> -glutamique décarboxylase
CAMP	<i>cis</i> -2-aminométhyl cyclopropanique	GAT	GABA transporter
CAN	nitrate de cérium et d'ammonium	Glu	acide glutamique
CB-GABA	acide 2-aminocyclobutanique	Gpn	Gabapentin
Cbz	carboxybenzyl	HATU	hexafluorophosphate de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium
CCM	chromatographie sur couche mince	HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
CF	5(6)-carboxyfluorescein	HOBt.H₂O	1-hydroxybenzotriazole hydrate
CG	chromatographie en phase gazeuse	HSQC	heteronuclear single quantum coherence
CNS	Système nerveux central	IBCF	chloroformate d'isobutyl
COSY	correlated spectroscopy, la tocsy ou total coorrelated spectroscopy	<i>i</i>Pr	isopropyl
CPP-115	cell penetrating agent ou acide (1 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-amino-4-difluorométhylényl-1-cyclopentanoïque	IR	infrarouge
DC	dichloroïsme circulaire	Leu	leucine
DCC	dicyclohexylcarbodiimide	LiHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
DIEA	diisopropyléthylamine	LMWG	low molecular weight gelator
DIPEA	diisopropyléthylamine	Lys	lysine

mCPBA	acide métachloroperbenzoïque
MEB	microscopie électronique à balayage
MET	microscopie électronique en transmission
MGC	concentration minimale de gélification
MOM	Méthoxyméthyl éther
MsCl	chlorure de méthanesulfonyle
MUSC	Muscimol
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
Pha	phénylacétate
Phth	phtalimide
PIS	passage intersystème
PLE	Pig Liver Esterase
PLP	pyridoxale 5'-phosphate
PMB	<i>p</i> -Methoxybenzyl éther
PMP	pyridoxamine phosphate
RMN	résonance magnétique nucléaire
RX	rayons X
SAA	γ -aminoacide sucre
SEM	scanning electron microscipy
Sens	sensibilisateur
SES	2-(triméthylsilyl)éthanesulfonyl
SPFM	scanning polarization force microscopy
SSA	semi-aldéhyde succinique
TACA	acide <i>trans</i> -4-aminocrotonique
TAMP	acide <i>trans</i> -2-aminométhyl cyclopropanique
TBAF	fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium
TBDPS	<i>t</i> -butyldiphénylsilyl éther
<i>t</i>-BuOH	<i>t</i> -butanol
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
THIP	4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4- <i>c</i>]pyridin-3-ol
TMS	triméthylsilyl
TOCSY	total correlated spectroscopy
TsCl	chlorure de 4-toluènesulfonyle
TsOH	Acide paratoluènesulfonique
UV	ultra-violet
Val	valine

Introduction

I- Les γ -aminoacides : Généralités et définitions

Les β - et les γ -aminoacides sont les homologues des α -aminoacides. Ils diffèrent de leurs analogues α - par la présence d'un ou deux carbones supplémentaires (C^β et C^γ) entre les deux groupements amine et acide. De ce fait, le squelette des γ -aminoacides peut être plus diversement substitué que celui de son analogue α . Les γ -aminoacides sont différenciés selon la position de leurs substituants. Par exemple un γ -aminoacide monosubstitué en C-2 est défini comme un « γ^2 -aminoacides » et un γ -aminoacide disubstitué en C-2 et C-3 est défini comme un « $\gamma^{2,3}$ -aminoacide » (**Figure 1**).

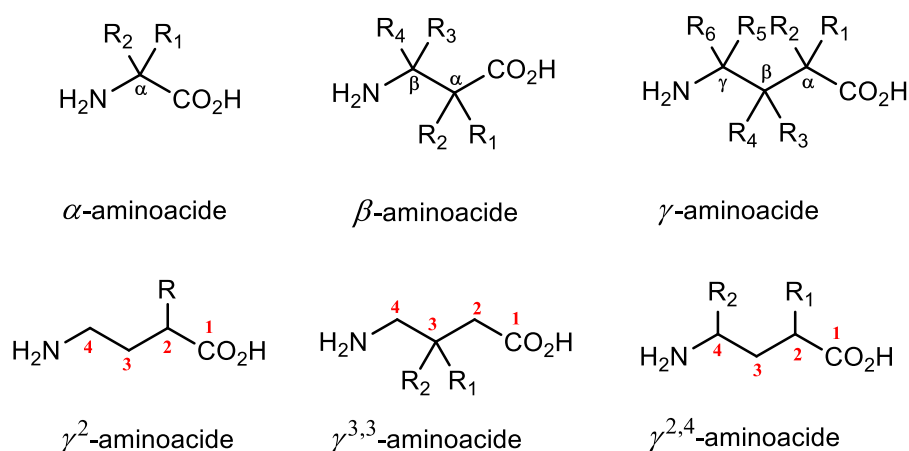


Figure 1 : Exemples d' α - β - et γ -aminoacides.

A- Le GABA et ses analogues

a- Définition et importance biologique

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) le prototype non-substitué d'un γ -aminoacide, est un produit naturel qui a été découvert en 1950 par Roberts et Frankel (**Figure 2**).¹ C'est le principal neurotransmetteur inhibiteur présent dans le système nerveux central (CNS) des mammifères.² Plus d'un tiers des neurones du cerveau utilisent le GABA dans la communication synaptique. Il est même estimé que sa concentration est de 200 à 1000 fois plus grande que celle d'autres neurotransmetteurs.³ Il est impliqué dans plusieurs fonctions biologiques bien connues comme l'anti-hypertension⁴ et l'anti-dépression⁵ et est aussi à l'origine de beaucoup de maladies comme l'épilepsie, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, ou encore la chorée de Huntington, toutes dues à des modifications de sa concentration dans le cerveau.⁶ La haute polarité du GABA ne lui permet pas de traverser la barrière hémato-encéphalique lors de son administration orale chez un patient, ce qui le rend inefficace comme agent thérapeutique.^{7,8} Compte tenu de son importance

biologique, les chercheurs s'intéressent à synthétiser des analogues de cette molécule.

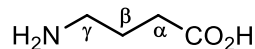


Figure 2 : L'acide γ -aminobutyrique – GABA.

1- La biosynthèse du GABA

La concentration du GABA dans le cerveau est contrôlée d'une part par l'acide *L*-glutamique décarboxylase (GAD) qui, en présence du cofacteur pyridoxal 5'-phosphate (PLP), catalyse la conversion du *L*-glutamate (ou acide *L*-glutamique) en GABA, et d'autre part par la GABA aminotransférase (GABA-AT) qui catalyse la transformation du GABA en semi-aldéhyde succinique (SSA) ; cette transformation accompagne la conversion de l' α -cétooglutarate (α -KG) en acide *L*-glutamique (*L*-Glu, un neurotransmetteur excitateur) (**Figure 3**).⁹

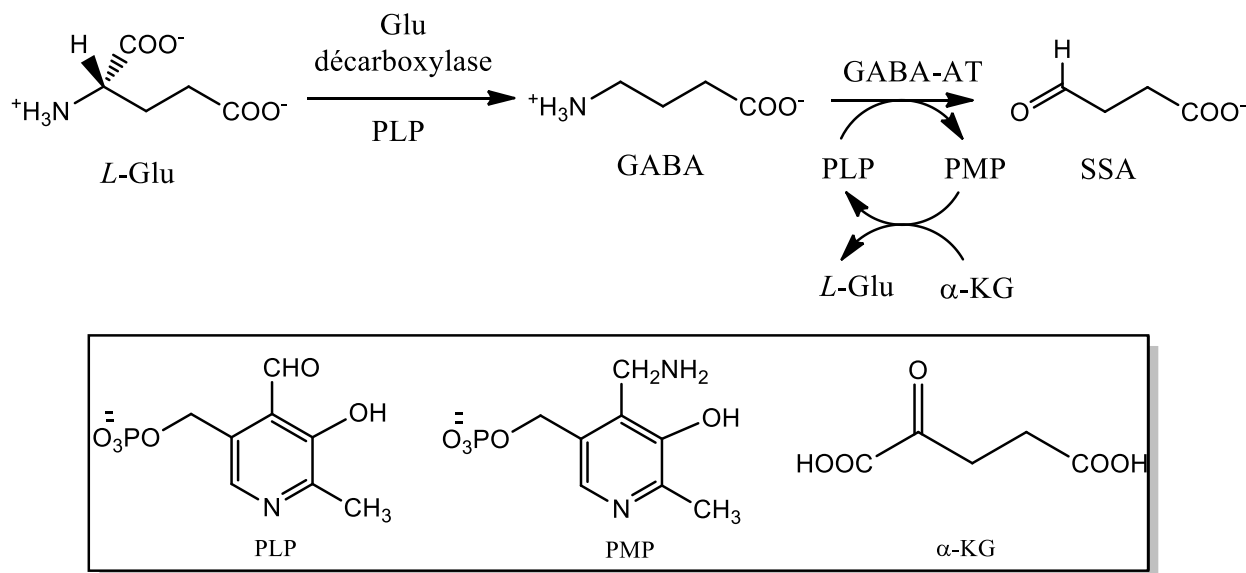


Figure 3: La régulation de la concentration du GABA dans le cerveau.

2- Mode d'action du GABA

Le GABA accomplit ses fonctions biologiques en se liant à trois classes différentes de neurorécepteurs distribués dans le cerveau des mammifères. La fixation des molécules du GABA sur ces récepteurs, qui sont des protéines membranaires, entraîne l'ouverture d'un canal ionique. L'entrée des ions à travers ce canal conduit à une hyperpolarisation de la cellule réceptrice et, par conséquent, à la transmission de l'influx nerveux à d'autres cellules. Généralement, les récepteurs du GABA sont divisés en trois groupes : GABA_A, GABA_B, et GABA_C.

Les récepteurs GABA_A appartiennent à la famille des récepteurs ionotropes sensibles à un ligand ou récepteurs-canaux. Ce sont des protéines membranaires qui ouvrent un canal ionique de Cl⁻ suite à leur liaison à un ligand ou neurotransmetteur. Ils sont la cible de plusieurs molécules ayant des propriétés sédatives, anxiolytiques, anticonvulsivantes, antiépileptiques et myorelaxantes comme le GABA, les benzodiazépines, les barbituriques, les alcools, et les picrotoxines. Ces substances augmentent la fréquence et la durée d'ouverture du canal chlorure, ce qui augmente la concentration de ces ions dans la cellule réceptrice, renforçant ainsi l'effet inhibiteur du GABA.¹⁰

Les récepteurs GABA_B appartiennent à la famille des métabotropes qui sont couplées à des protéines membranaires appelées protéines G,³ qui entraînent l'ouverture de canaux ioniques à Ca²⁺ et à K⁺. Ils sont insensibles aux modulateurs du GABA_A, autre que le GABA lui-même.

Comme les GABA_A, les GABA_C sont des récepteurs ionotropes mais qui sont insensibles aux barbituriques, benzodiazépines, baclofène, et aux stéroïdes neuroactifs.³

b- Les analogues du GABA

Le GABA est une molécule flexible qui peut exister sous de nombreuses conformations étendues ou repliées. Il peut donc activer les récepteurs GABA_A, GABA_B et GABA_C en ayant une conformation différentes auprès de chacun de ces récepteurs.¹¹ La détermination de ces différentes conformations en fonction du récepteur représente un challenge pour les chimistes et biochimistes. Par exemple, le (*R*)-(-)-baclofène, présente une grande affinité envers les GABA_B, et que l'acide *cis*-4-aminocrotonique (CACA) active sélectivement les GABA_C (**Figure 4**).¹¹

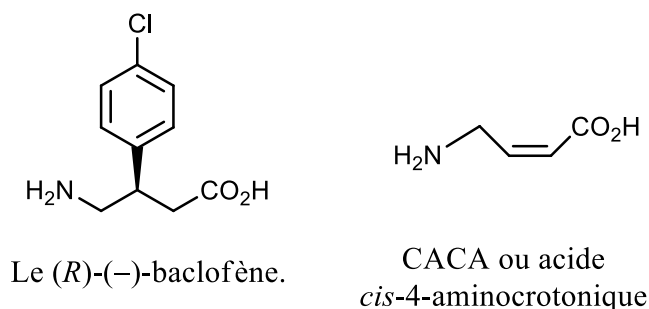


Figure 4: Quelques dérivés du GABA.

Afin d'avoir une compréhension approfondie de la conformation du GABA auprès de chaque récepteur, et afin d'obtenir de nouveaux médicaments imitant ses fonctions biologiques, les chimistes s'intéressent à la synthèse d'analogues du GABA.^{3,12,13} Dans la littérature, on trouve des stratégies de synthèse communes pour ces analogues qui consistent à augmenter leur lipophilie et

ainsi faciliter leurs accès au CNS, et à rigidifier leur squelette.⁷ Ceci est réalisé par introduction des doubles ou triples liaisons comme dans l'acide *trans*-4-aminocrotonique (TACA),¹⁴ des cycles comme dans l'acide *trans*-2-aminométhyl cyclopropanique (TAMP)¹⁵ ou avec des systèmes hétérocycliques comme dans l'Isoguvacine¹⁶ (**Figure 5**).

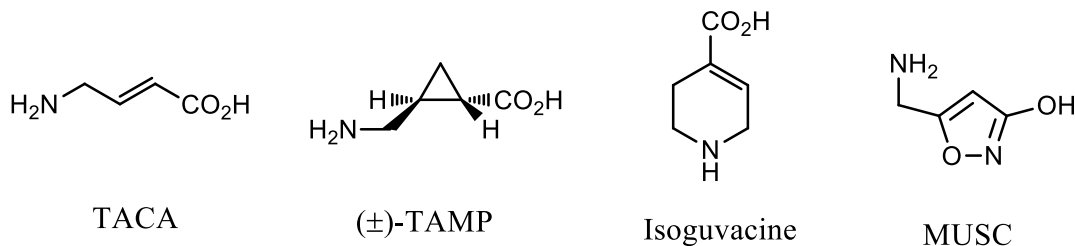


Figure 5: Quelques analogues rigidifiés du GABA.

Weatherby et coll.¹⁷ ont montré que la forme étendue des analogues du GABA, comme le Muscimol (MUSC) extrait d'un champignon, *l'Amanita Muscaria*, l'acide *trans*-4-aminocrotonique-TACA et le TAMP racémique activent les récepteurs GABA_A. Par contre, une forme repliée comme l'Isoguvacine vise les récepteurs GABA_C (**Figure 5**).¹⁸

On peut différencier deux catégories d'analogues du GABA, les dérivés acycliques et les dérivés cycliques, qui ont déjà trouvé des applications comme médicaments :

1- Les analogues acycliques et leurs synthèses

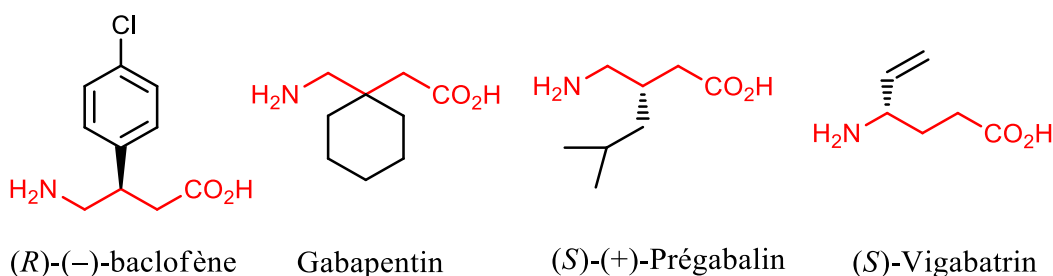


Figure 6 : Analogues acycliques du GABA.

Le baclofène (Lioresal®) (**Figure 6**) a été le premier analogue de GABA décrit dans la littérature. Il présente une affinité envers les récepteurs GABA_B. Il a été synthétisé sous forme énantiopure par Keberle en 1962, et son isomère *R* montre une affinité trois fois plus grande que sa forme racémique envers les GABA_B.¹⁹ Le Baclofène est un relaxant musculaires, souvent utilisé pour le traitement des spasmes.

Un deuxième analogue $\gamma^{3,3}$ -disubstitué d'une grande importance est le Gabapentin (Gpn). Le cyclohexyle augmente la lipophilie du GABA, et facilite la traversée de la barrière hémato-encéphalique.¹⁵ Le Gabapentin (Neurotin) et le (*S*)-pregabalin (Lyrica®)²⁰ sont des médicaments antiépileptiques utilisés aussi pour le traitement des neuropathies et de l'anxiété.²¹ Ils ont tous les deux des propriétés anti-convulsivantes.^{22,23}

Le Vigabatrin est d'autre part un inhibiteur spécifique de l'enzyme GABA-AT responsable de la dégradation du GABA.²⁴ Sa grande ressemblance structurale avec le GABA est à l'origine de sa capacité d'interagir avec le GABA-AT. Il a été montré que cette molécule est un médicament antiépileptique efficace.²⁵ Elle est commercialisée sous forme racémique sous le nom de Sabril®, cependant seul l'isomère *S* possède une activité pharmacologique.²⁶

Différentes méthodes de synthèses de ces molécules acycliques ont été décrites dans la littérature.

i- Le (R)-Baclofène

Une synthèse simple et efficace du (*R*)-Baclofène a été décrite récemment dans la littérature par Kuo et Wong.²⁷ Elle commence par une réaction entre l'acide *p*-chlorocinamique **1** et l'auxiliaire chirale **2**, suivie par une addition de Michael avec le nitrométhane pour donner le composé **3** avec une bonne diastéréosélectivité. Ensuite, une hydrolyse est réalisée pour faire le clivage de l'auxiliaire chirale, et produire le composé **4**, qui subit une réduction afin de donner le (*R*)-Baclofène (**Schéma 1**).

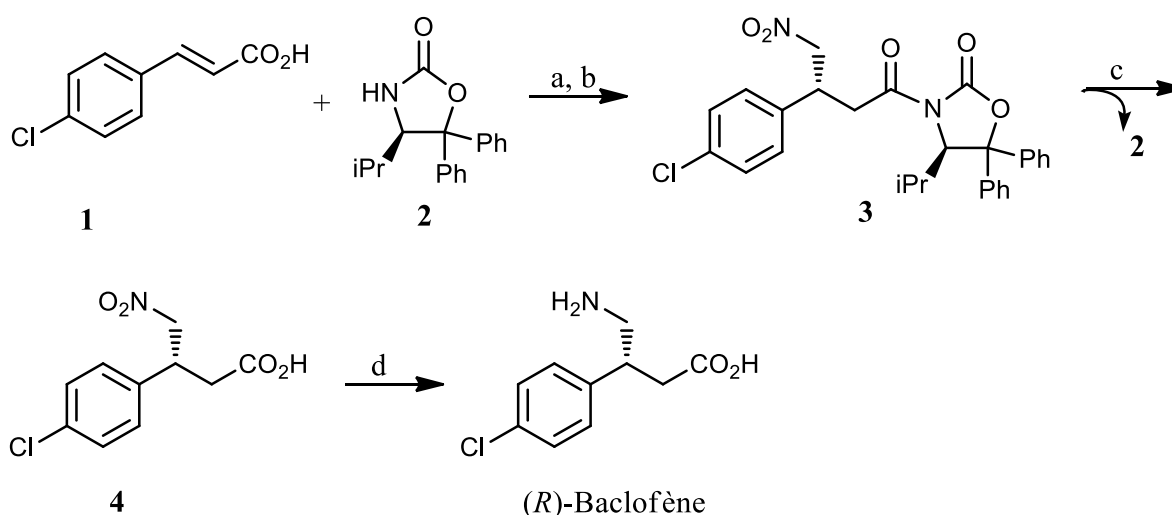


Schéma 1: Synthèse du (*R*)-Baclofène ; a) i- SOCl₂, toluène, DMF, reflux, ii- Et₃N, CH₂Cl₂, HCl ; b) CH₃NO₂, tetraméthylguanidine, CH₂Cl₂, 0-4 °C ; c) MeOH, H₂O, NaOH, t.a. ; d) H₂, Ni (cat.), 50 °C, eau.

ii- Le Gabapentin

Plusieurs synthèses ont été décrites pour le Gabapentin et ces méthodes nécessitent la formation d'un intermédiaire nitrile qui est ensuite hydrogéné.¹⁵ Une autre synthèse a été mise au point pour obtenir avec une haute pureté l'hydrochlorure de Gabapentin (**Gpn.HCl**), via la formation de l'intermédiaire 3-azaspiro[5,5]-undécane-2,4-dione **6**. Cette synthèse comporte seulement deux étapes : une réaction entre le mélange anhydride acétique/acétate d'ammonium et l'acide 1,1-cyclohexane diacétique commercial **5** à 160-170 °C, suivie du traitement de l'intermédiaire **6** avec de l'hydroxyde de sodium et NaOCl dans l'eau (**Schéma 2**).⁷

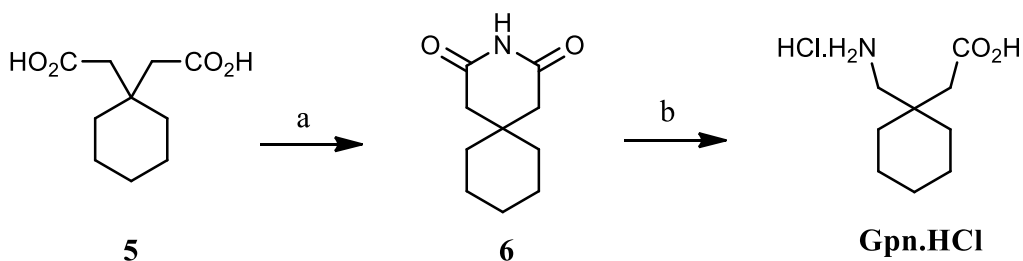


Schéma 2: Synthèse du Gabapentin ; a) i- $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OAc}$, Δ , ii- butan-2-ol, t.a. ; b) i- NaOH , H_2O 50-80 °C, ii- NaOCl/NaOH 0-30 °C, iii- HCl (32 %)

iii- Le Prégabalin

Le Prégabalin est préparé selon diverses méthodes, soit par un réarrangement de Hofmann,²⁸ soit en utilisant un malonate de diéthyle.²⁹ La recherche de nouvelles voies de synthèse plus efficaces, et surtout réalisables à l'échelle commerciale, a permis l'obtention du Prégabalin à partir de produits de départ facilement disponibles et pas chers. Parmi ces méthodes, une voie de synthèse courte, ayant des avantages économiques et environnementaux consiste en une hydrogénation asymétrique et une hydrolyse du cyano-hexanoate **7**, synthétisé à partir de produits commerciaux (2-méthylpropanale et acrylonitrile), produisant le composé **8**. La réduction du nitrile par hydrogénation catalytique suivie par une acidification donne le Prégabalin (**Schéma 3**).³⁰

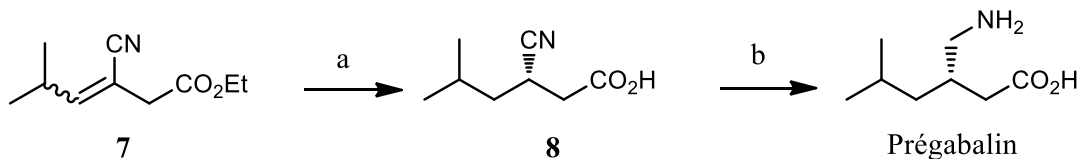


Schéma 3: Synthèse du Prégabalin ; a) H_2 , Complexe de Rhodium, solvant protique ; b) i- H_2 , Ni (cat.), ii- HOAc .

iv- Le Vigabatrin

Vu l'importance thérapeutique du Vigabatrin, plusieurs voies de synthèse ont été menées pour synthétiser cette molécule en grandes quantités en série racémique, avec un bon rendement, et à partir de produits commerciaux pas cher.³¹ Duclos a trouvé une courte voie de synthèse, compétitive du point de vue économique, et applicable à l'échelle industrielle, pour la préparation du Vigabatrin.³¹ La synthèse comporte trois étapes : le succinimide **9** est tout d'abord réduit par un hydrure (LiAlH_4 , NaBH_4) en présence d'un alcool et d'un acide, pour donner le 5-alkyloxy-2-pyrrolidone **10**. L'étape suivante consiste à une réaction avec deux équivalents d'organomagnésien (chlorure, bromure ou iodure de vinyle magnésium) pour donner le 5-vinyl-2-pyrrolidone **11**. Finalement, une hydrolyse de celui-ci en milieu aqueux acide ou basique, permet d'obtenir le Vigabatrin (**Schéma 4**).

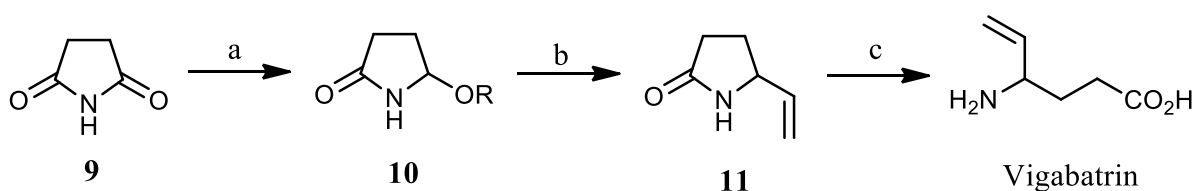


Schéma 4: Synthèse du Vigabatrin ; a) NaBH_4 , ROH, H^+ ; b) bromure de vinyle magnésium, THF ; c) KOH, $\text{H}_2\text{O}/i\text{PrOH}$.

2- Les analogues cycliques et leurs synthèses

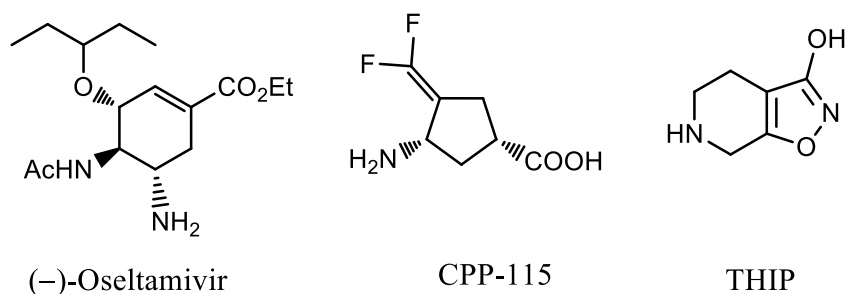


Figure 7 : Analogues cycliques du GABA.

Certains dérivés cycliques synthétiques du GABA présentent un intérêt thérapeutique important. L'(-)-Oseltamivir (**Figure 7**), connu sous le nom commercial de Tamiflu[®] a une action antivirale sur le virus de la grippe H5N1. Vu la demande massive de ce produit, plusieurs méthodes ont été décrites^{32,33,34} afin d'optimiser sa synthèse et pouvoir répondre au besoin du marché. Trost et

Zhang³⁵ ont réussi à produire l'(-)-Oseltamivir en 8 étapes, en utilisant des matériaux simples, avec un rendement de 30 %. La lactone commerciale **12** a subi une ouverture et une désymétrisation du cycle en présence d'un catalyseur de palladium $[(\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5\text{PdCl})_2]$, du (*R,R*)-**13**, et du TMS-phtalimide pour donner le produit **14**. Une sulfénylation suivie d'une oxydation a donné le diène **15**. Celui-ci a subi une aziridination sélective grâce à un catalyseur de rhodium **16** en présence de $(\text{PhI}(\text{O}_2\text{CCMe}_3)_2)$, de SESNH_2 ($\text{SES} = 2\text{-(triméthylsilyl)éthanesulfonyl}$) et de MgO dans le chlorobenzène pour donner l'aziridine **17**. Ce composé a subi une ouverture en présence de $\text{BF}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ dans du pentan-3-ol, suivi d'une acylation accélérée par l'utilisation des microondes à $150\text{ }^\circ\text{C}$ ce qui a produit le composé **18**. Puis le groupement SES est enlevé par traitement du produit **18** par le TBAF. Le produit obtenu a été ensuite chauffé dans de l'hydrazine éthanolique ce qui a fourni l'(-)-Oseltamivir (**Schéma 5**).

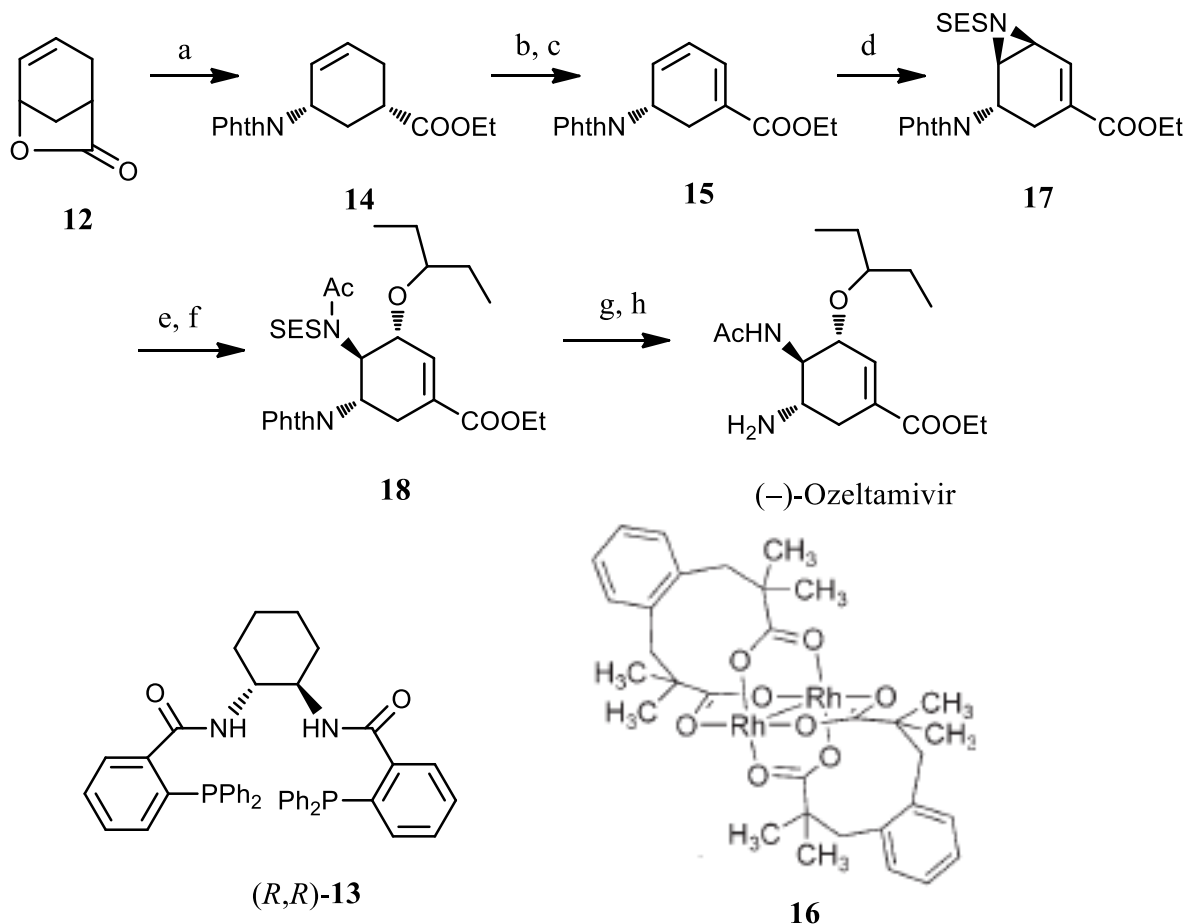


Schéma 5 : Synthèse de l'(-)-Oseltamivir ; a) i- $[(\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5\text{PdCl})_2]$, (*R,R*)-**13**, TMS-phtalimide, THF, $40\text{ }^\circ\text{C}$, ii- $\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, EtOH, reflux ; b) KHMDS , PhSSO_2Ph , THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ -t.a. ; c) *m*CPBA, NaHCO_3 , $0\text{ }^\circ\text{C}$; d) **14**, SESNH_2 , $\text{PhI}(\text{O}_2\text{CCMe}_3)_2$, MgO , PhCl , $0\text{ }^\circ\text{C}$ -t.a. ; e) $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$, pentan-3-ol, $75\text{ }^\circ\text{C}$; f) DMAP, pyridine, Ac_2O , MO, $150\text{ }^\circ\text{C}$; g) TBAF, THF, t.a. ; h) NH_2NH_2 , EtOH, $68\text{ }^\circ\text{C}$.

Silverman et coll. ont montré que l'acide (1*S*,3*S*)-3-amino-4-difluorométhylén-1-cyclopentanoïque (CPP-115, **Figure 7**) peut être utilisé pour traiter l'addiction à la cocaïne.³⁶ Quelques synthèses de ce composé ont été réalisées, parmi lesquelles celle de Silverman et Pan.³⁷ Le composé **19** a subi une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons en présence de F₂CHPO(OEt)₂ et de *t*-BuLi pour donner le produit difluoré **20**. Celui-ci a été ensuite déprotégé par du nitrate de cérium et d'ammonium (CAN) pour fournir le composé **21**, puis hydrolysé pour donner le chlorure de CPP-115 (**Schéma 6**).

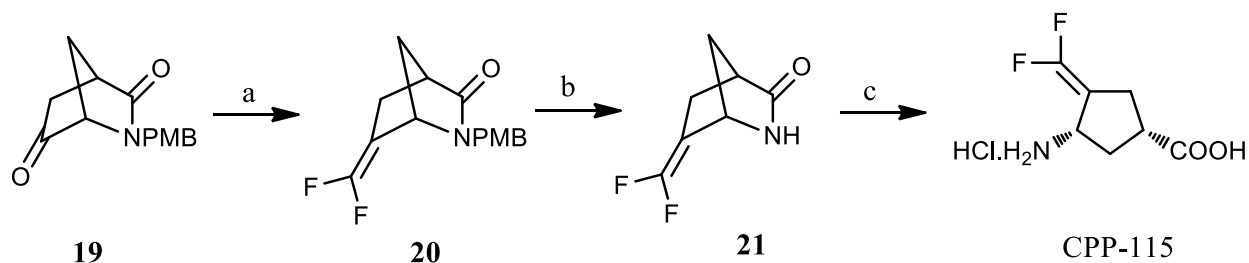


Schéma 6: Synthèse du CPP-115 ; a) F₂CHPO(OEt)₂, *t*-BuLi, pentane, -78 °C ; b) CAN, CH₃CN, H₂O, 70 °C ; c) HCl (4N), 70 °C.

Le Gaboxadol ou 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-*c*]pyridin-3-ol (THIP, **Figure 7**) est un dérivé du Muscimol qui montre des propriétés analgésiques après injection ou administration orale.³⁸ Le THIP peut être synthétisé à partir du composé **22** en 5 étapes. Une hydrogénation catalytique dans l'éthanol, suivie par la protection du carbonyle en formant le dioxolane **23**. Ce produit a été traité avec de l'hydroxylamine en présence de KOH, puis désacétylé en milieu basique, et cyclisé pour donner le composé **24**. Une dernière étape consiste à un traitement du produit obtenu **24** par de la triéthylamine dans l'éthanol pour former le THIP (**Schéma 7**).

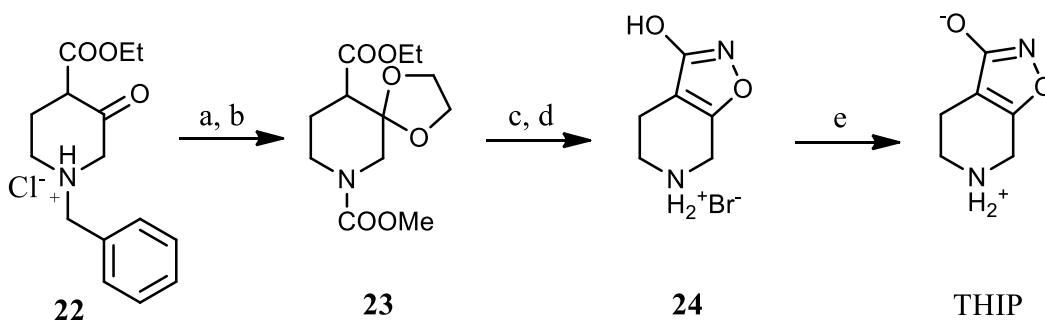


Schéma 7 : Synthèse du THIP ; a) i- H₂, Pd/C, éthanol, ii- CH₃COOCl, b) éthylène glycol, TsOH, benzene, reflux ; c) i- NH₂OH, KOH, ii- HCl 70 °C ; d) HBr, HOAc ; e) Et₃N, EtOH.

La littérature décrit la synthèse d'autres dérivés cycliques du GABA qui sera détaillée dans ce qui suit.

i- Les γ -aminoacides cyclopropaniques :

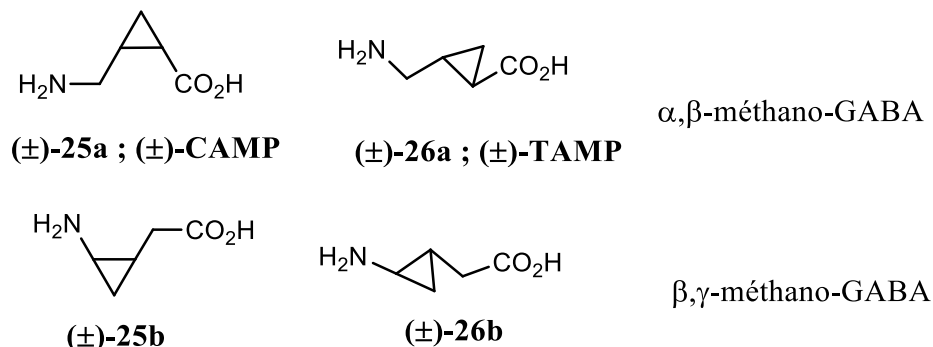


Figure 8 : Des analogues cycliques du GABA à 3 chaînons.

Des études ont montré l'effet des énantiomères du CAMP et du TAMP dans l'activation des récepteurs GABA_A et GABA_C . La stéréochimie a montré une importance dans la détermination des propriétés pharmacologiques exprimées par ces analogues. En effet le (+)-CAMP est un agoniste des récepteurs GABA_C alors que le (-)-CAMP en est un faible antagoniste.³⁹ Taguchi et coll ont décrit en 1994 une synthèse énantio pure multi-étape des (+)-CAMP, (-)-CAMP, (+)-TAMP et (-)-TAMP via une réaction de Simmons-Smith sur des alcools allyliques (**Schéma 8**).⁴⁰ Cette réaction est la méthode la plus utilisée pour réaliser des cyclopropanations stéréosélectives sur les oléfines. En effet, les composés **Z 27** et **E 29** subissent une même sélectivité faciale dans la cyclopropanation de la double liaison. L'encombrement du groupement R, protecteur de l'alcool allylique dans les composés **27** et **29**, augmente la diastéréosélectivité de la réaction.

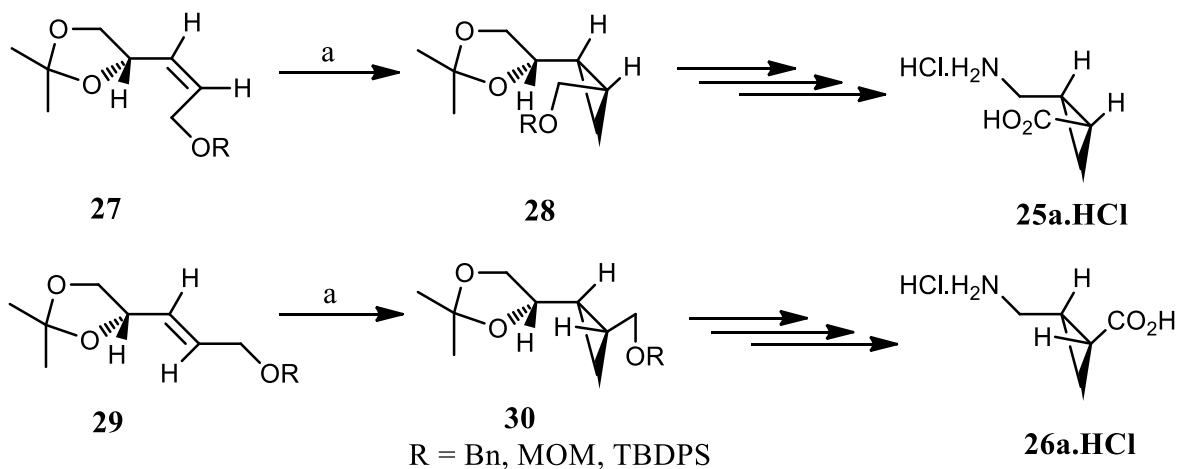


Schéma 8 : Cyclopropanation diastéréosélective par réaction de Simmons-Smith ; a) Et_2Zn , CH_2I_2 , CH_2Cl_2 , -23°C à 0°C .

D'autres synthèses du CAMP et du TAMP énantio-pur peuvent être trouvées dans la littérature comme celle de Mohapatra en 1999 fournissant le (+)-TAMP.HCl (+)-**26a.HCl** par une synthèse multi-étape. La cyclopropanation sur l'alcool *trans*-cinammyle **31** se produit en utilisant un ligand dioxaborolane chiral dérivé de l'acide (+)-tartrique (**Schéma 9**).⁴¹

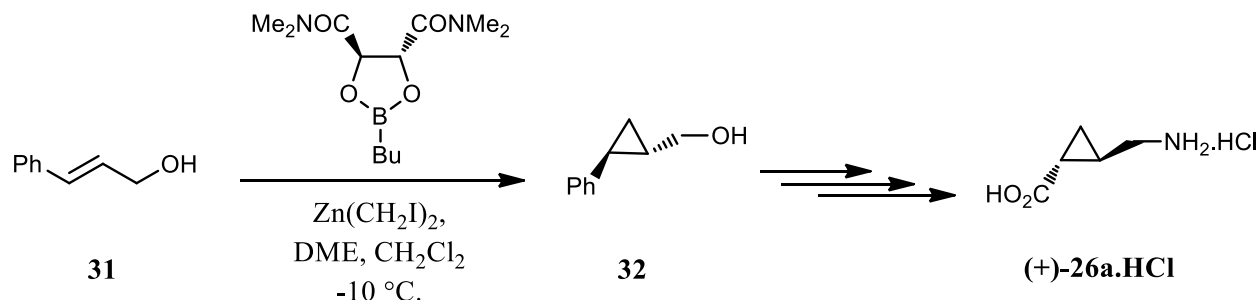


Schéma 9 : Synthèse du (+)-TAMP.HCl (+)-**26a.HCl** par cyclopropanation asymétrique.

Sartillo-Piscil et coll.⁴² ont utilisé une alkylation intramoléculaire pour faire la cyclisation du composé **33** afin de synthétiser le (+)-CAMP **25a** (**Schéma 10**).

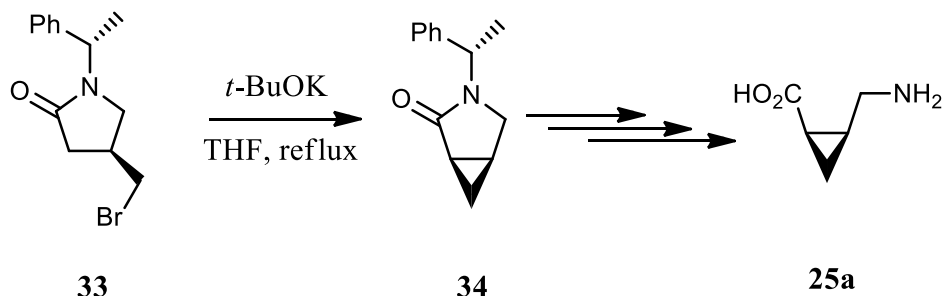


Schéma 10 : Cyclopropanation par cyclisation intramoléculaire.

De leur côté, Ley et coll.⁴³ ont désymétrisé le diester cyclopropanique **35** par hydrolyse suivi d'une réduction, une substitution nucléophile pour accéder à l'acide aminé correspondant (-)-CAMP.HCl, en utilisant l'estérase de foie de porc supportée (Pig Liver Esterase = PLE) (**Schéma 11**).

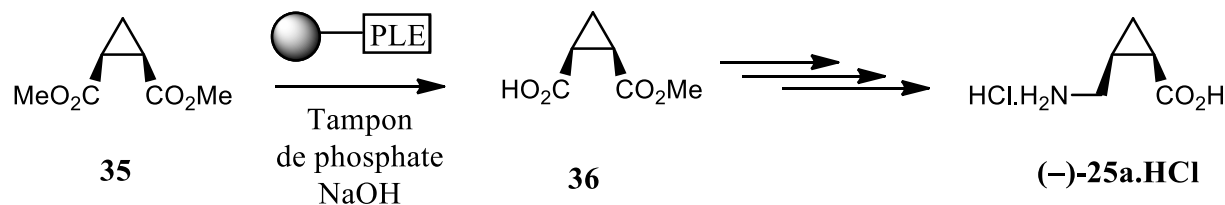


Schéma 11: Désymétrisation du diester-méso cyclopropanique.

Une synthèse des dérivés du *trans*- β,γ -méthano-GABA énantiomériquement purs a été décrite. Aitken et coll.⁴⁴ ont utilisé la réaction de Kulinkovich de Meijere pour effectuer une cyclopropanation du formamide chirale **37** en utilisant le méthyl triisopropoxide de titane avec le bromure de 3-buténylmagnésium. Cela a fourni un mélange des diastéréoisomères *trans* **39** et *cis* **40** avec respectivement un rapport de 9:1. Seuls les stéréoisomères *trans* **39** ont été séparables par colonne chromatographique, et ont donné les produits énantiopurs (+)-**41** et (-)-**41** (Schéma 12).

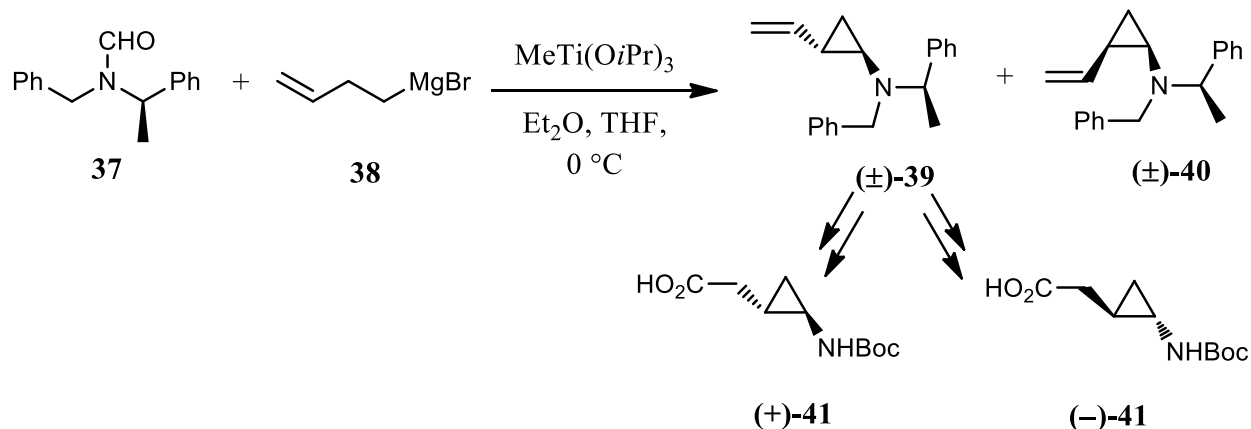
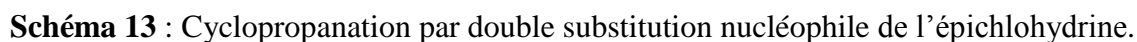
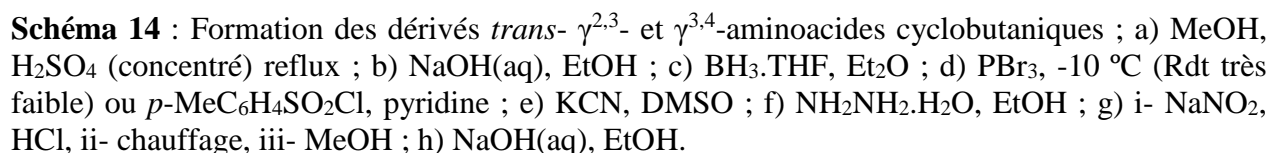


Schéma 12 : Cyclopropanation par la réaction de Kulinkovich-de Meijere.

Récemment, Nakada et coll.⁴⁵ ont décrit la synthèse d'une forme énantiopure de chacun des isomères *cis* et *trans* de l' α,β -méthano-GABA et du β,γ -méthano-GABA. La cyclopropanation a été effectuée par attaque nucléophile régiosélective du phénylsulfonylacétonitrile sur la (*R*)-épichlorohydrine **42** pour former le bicyclic **43**. Celui-ci a été ensuite hydrolysé en milieu acide pour donner le composé **44** précurseurs des aminoacides (-)-**26a.HCl** et (-)-**25a.HCl** (Schéma 13). Leurs énantiomères ont été obtenus à partir de la (*S*)-épichlorohydrine suivant le même protocole. Les *trans*-et *cis*- β,γ -méthano-GABA (+)-**26b.HCl**, (-)-**26b.HCl**, (+)-**26a.HCl** et (-)-**26a.HCl** ont été synthétisés à partir du même bicyclic **44**. Nakada et col. ont étudié l'effet des dérivés de β,γ -méthano-GABA sur les récepteurs du GABA. Ils ont trouvé que le dérivé (-)-**26b** est un inhibiteur de la GAT (GABA transporter), et qu'il possède un effet anticonvulsivant.



Les synthèses des dérivés cyclobutaniques du GABA sont plus rares que celles des dérivés cyclopropaniques. Westwood et coll. ont synthétisé le *trans*- $\gamma^{3,4}$ -aminoacide cyclobutanique racémique (\pm)-**50** à partir de l'acide *trans*-cyclobutane-1,2-dicarboxylique (\pm)-**45** commercial.⁴⁶ Ce dernier a été estérifié pour donner le diester (\pm)-**46**, qui ensuite a subi une hydrolyse partielle pour fournir le monoester (\pm)-**47**. Celui-ci a été réduit sélectivement puis transformé en dérivé bromé ou tosylé (\pm)-**48** et (\pm)-**49**. Chacun de ces produits a ensuite été traité avec le cyanure du potassium, puis avec l'hydrazine, suivi d'un réarrangement de Curtius et d'une hydrolyse basique pour fournir (\pm)-**50** avec un rendement global de 6 % (**Schéma 14**).



Le tosylate intermédiaire (\pm)-**49** a été le composé de départ pour une synthèse du *trans*- $\gamma^{2,3}$ -aminoacide cyclobutanique (\pm)-**53**,⁴⁷ Le tosylate (\pm)-**49** a été traité par le phthalimide de potassium. Une déphthaloylation par la méthylamine et une hydrolyse, ont conduit à l'aminoacide (\pm)-**53** avec un rendement global de 11 %. (**Schéma 15**).

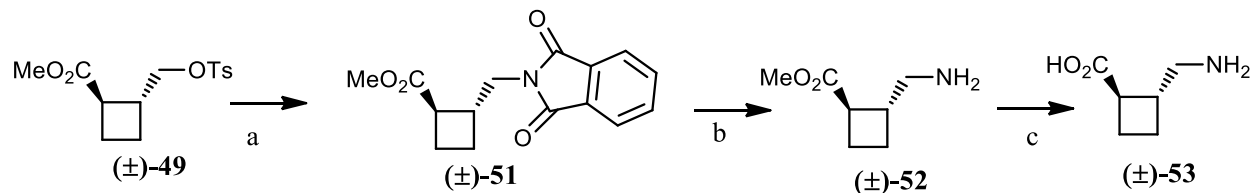


Schéma 15 : a) potassium phthalimide, DMF, Δ , 1 h ; b) MeNH₂, EtOH, t.a, 16 h; c) NaOH(aq), EtOH, Δ , 4 h.

De la même façon, le *cis*- $\gamma^{2,3}$ -aminoacide cyclobutanique (\pm)-**57** a été préparé à partir de la lactone synthétisée⁴⁸ (\pm)-**55** avec un rendement global de 38 %. La lactone a été obtenue par hydrolyse et cyclisation du mélange commercial *cis* et *trans* 1,2-dicyanocyclobutane **54**. (**Schéma 16**).

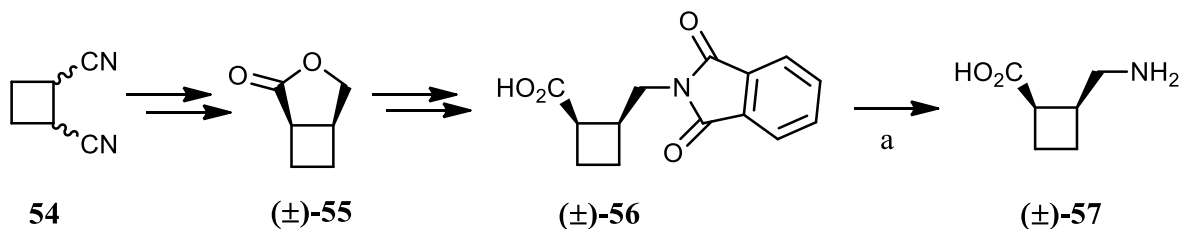


Schéma 16 : a) MeNH₂, EtOH.

La littérature présente trois synthèses du *cis*- $\gamma^{2,3}$ -aminoacide cyclobutanique **57** sous forme énantiomériquement pure. Orena et coll.⁴⁹ ont décrit en 1999 la première synthèse du (+)-**57.HCl** et du (–)-**57.HCl** énantipurs suivant une synthèse multi-étapes avec des rendements globaux de 15 % et 19 % respectivement. Dans cette synthèse, le composé de départ **58** a subi une cyclisation en présence de NaH dans du THF pour donner majoritairement le composé **65** (e.d. **59:60** 80:20), un inversement du diastéréosélectivité (e.d. **59:60** 30:70) a été obtenu en utilisant l'éthoxyde de sodium dans de l'éthanol. Les composés **59** et **60** ont été séparés par chromatographie sur gel de silice. Le composé **59** a été converti en iodure **61**. L'addition de l'hexaméthylidisilazide de Lithium a donné le produit bicyclique **62**. Le clivage du groupe phényléthyl a fourni l'amide **63**, qui par hydrolyse en présence de HCl 1M a généré l'aminoacide (–)-**57.HCl**. Le composé **60** a subi le même protocole pour donner l'aminoacide (+)-**57.HCl**. La formation du cycle à quatre a été obtenue par substitution nucléophile intramoléculaire sur le dérivé iodé (**Schéma 17**).

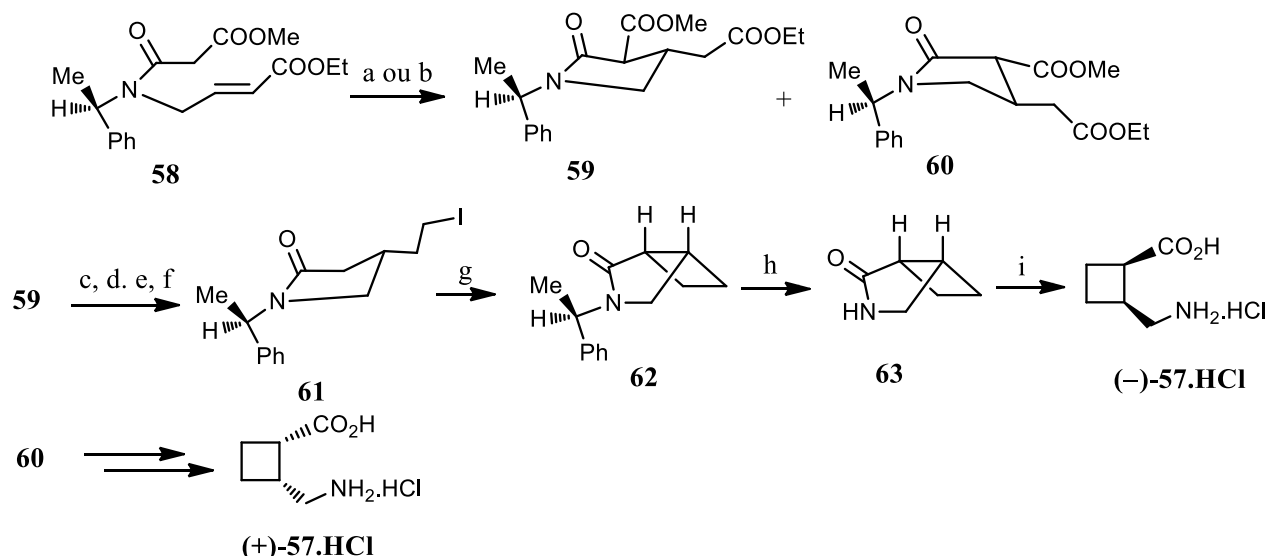


Schéma 17 : a) NaH, THF, -78 °C e.d 80:20 ; b) NaOEt, EtOH, -78 °C, e.d. 30:70 ; c) DMF, NaCl, 80 °C ; d) LiBH₄, THF, 0 °C ; e) MsCl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C ; f) NaI, acétone, t.a ; g) LiHMDS, THF, -15 °C, 12 h ; h) Li-NH₃, -78 °C i) 1M HCl, 82 °C, 12 h.

La deuxième synthèse décrite par Ley et coll. en 2002,⁴³ a été effectuée via une désymétrisation du meso-diester **64** en présence d'une estérase supportée. L'acide **65**, ainsi obtenu a subi une réduction puis une cyclisation pour donner la lactone **66**. L'ouverture de celle-ci en présence de phthalimide de potassium a pu donner l'acide **67**, qui a contribué à la formation du *cis*- $\gamma^{2,3}$ -aminoacide cyclobutanique **57** avec un rendement global de 39 % (**Schéma 18**).

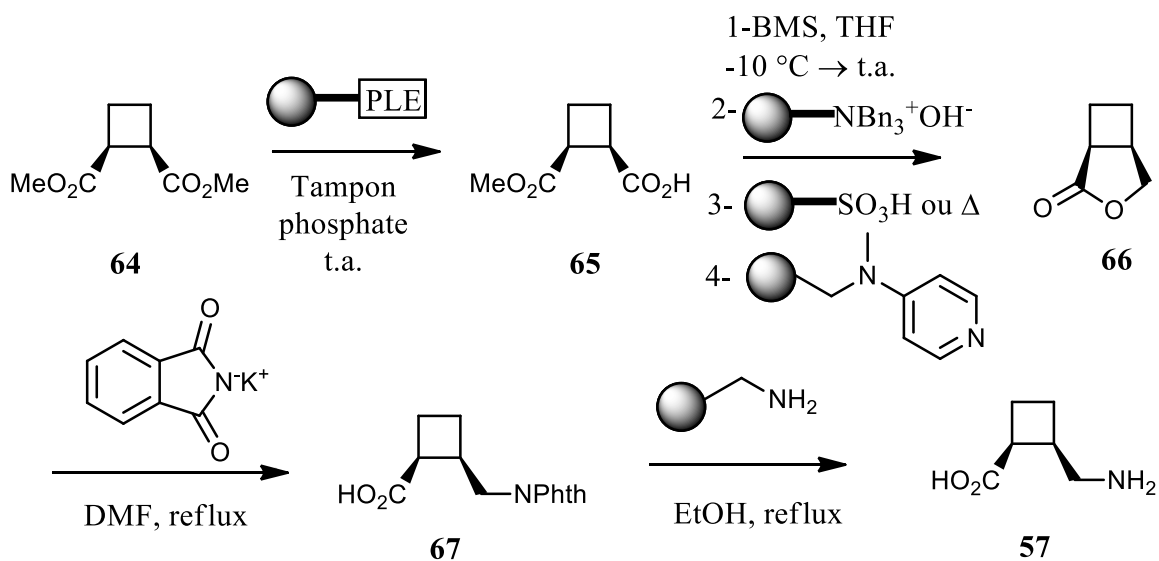


Schéma 18 : Synthèse du *cis*- $\gamma^{2,3}$ -aminoacide cyclobutanique **57**.

Plus récemment, une synthèse de (+)-**57** et (-)-**57** a été réalisée par l'équipe d'Aitken⁵⁰ avec des rendements globaux de 11 % et 12 % respectivement en 6 étapes. Dans ce travail, le cycle à quatre

chaînons a été formé par une réaction de photocycloaddition [2+2] à partir du lactame conjugué (–)-**70**, obtenu par la réaction entre un 2,5-diméthoxy-2,5-dihydrofurane **68** avec la (1*S*)-phényléthylamine **69**, pour former les cycloadduits (–)-**71** et (–)-**72**. La copule chirale du bicyclic (–)-**71** a subi un clivage homolytique pour donner le composé (+)-**73**. La fonction amine a ensuite été protégée par le Boc pour fournir le produit (+)-**74**, qui a subi une hydrolyse suivie d’une déprotection de l’amine ce qui conduit à la formation du *cis*- $\gamma^{2,3}$ -aminoacide cyclobutanique (–)-**57**. Le composé (–)-**72** a subi le même protocole pour donner l’acide amino (+)-**57** (Schéma 19).

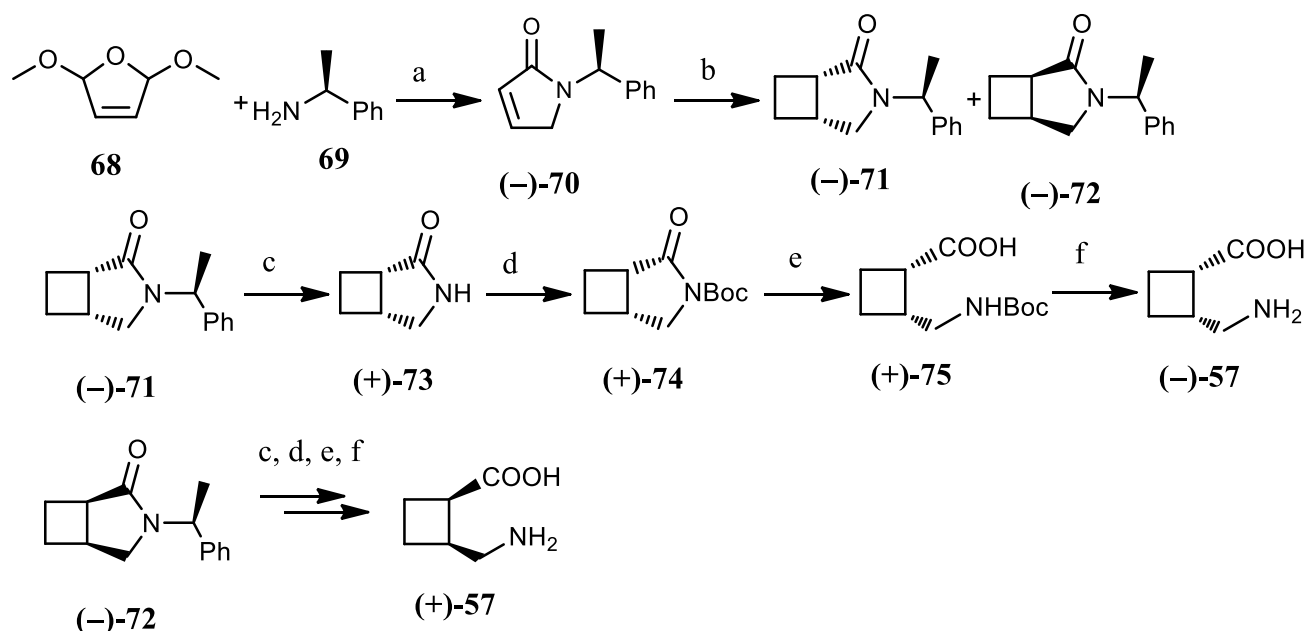


Schéma 19 : a) i-HCl, H₂O, t.a, ii-Na₂CO₃ ; b) éthylène, hv, Pyrex, acétone, 9 h ; c) Na, NH₃ liq, THF, *t*-BuOH, -33 °C, d) Boc₂O, DMAP, CH₃CN, t.a.; e) LiOH, THF/H₂O, t.a; f) i-TFA, CH₂Cl₂, t.a. ii-Dowex-H⁺.

La première synthèse du *trans*- $\gamma^{2,3}$ -aminoacide cyclobutanique **53** sous forme énantiomériquement pure (à laquelle j’ai contribué lors de mon stage de M2) a été réalisée récemment par l’équipe Aitken⁵¹ à partir des lactames bicycliques (–)-**71** et (–)-**72**. Celui-ci a subi une coupure de la copule chirale, puis une protection de l’atome d’azote par un groupement Boc pour donner le produit (+)-**73**. Le lactame protégé (+)-**73** a ensuite été converti en *cis*-carboxamide correspondant, qui après une épimérisation/hydrolyse a généré le composé (–)-**76**. Celui-ci a subi une déprotection de l’amine ce qui a conduit à la formation du *trans*- $\gamma^{2,3}$ -aminoacide cyclobutanique (–)-**53**. Le composé (–)-**72** subit le même protocole pour donner l’acide amino (+)-**53** (Schéma 20).

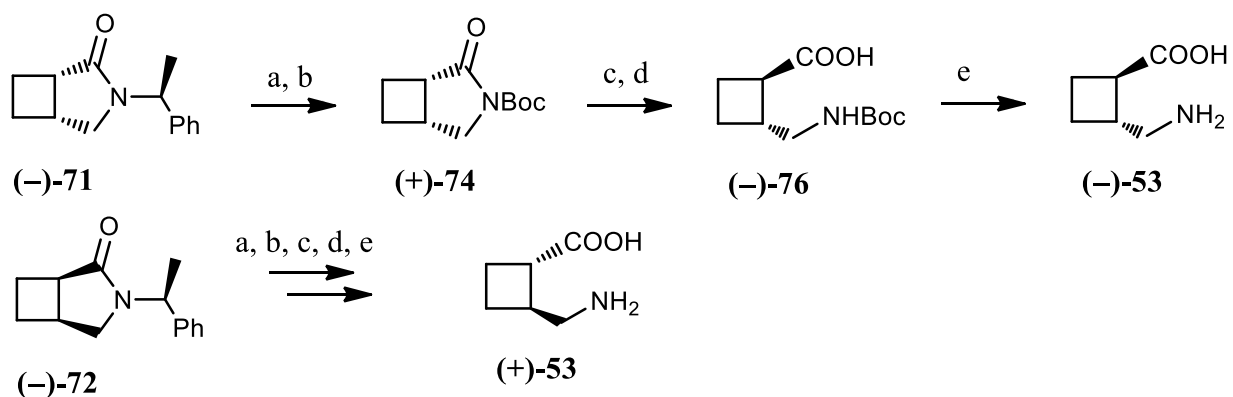


Schéma 20 : a) Na, NH₃ liq., THF/t-BuOH ; b) Boc₂O, DMAP, CH₃CN ; c) NH₃/AlMe₃, CH₂Cl₂ ; d) NaOH, MeOH, 16 h, Δ ; e) i-TFA, CH₂Cl₂, t.a. ii-Dowex-H⁺.

Quelques synthèses de dérivés d' α,γ -méthano-GABA ont été décrites dans la littérature. Parmi lesquelles une synthèse racémique⁵² en 1980 qui a utilisé l'azoture cyclobutanique **81** pour former les aminoacides correspondants *cis*-**82** et *trans*-**83**. L'azoture **81** a lui-même été synthétisé en 1957 en 6 étapes⁵³ à partir de l'épibromhydrine **77** par réaction avec le bromobenzène **78**, en présence du chlorure mercurique pour former le produit **79**. Celui-ci a servi à la formation du cycle à 4 par une simple réaction avec le 1,3-diester (CH₂(CO₂C₂H₅)₂) en milieu basique (**Schéma 21**).

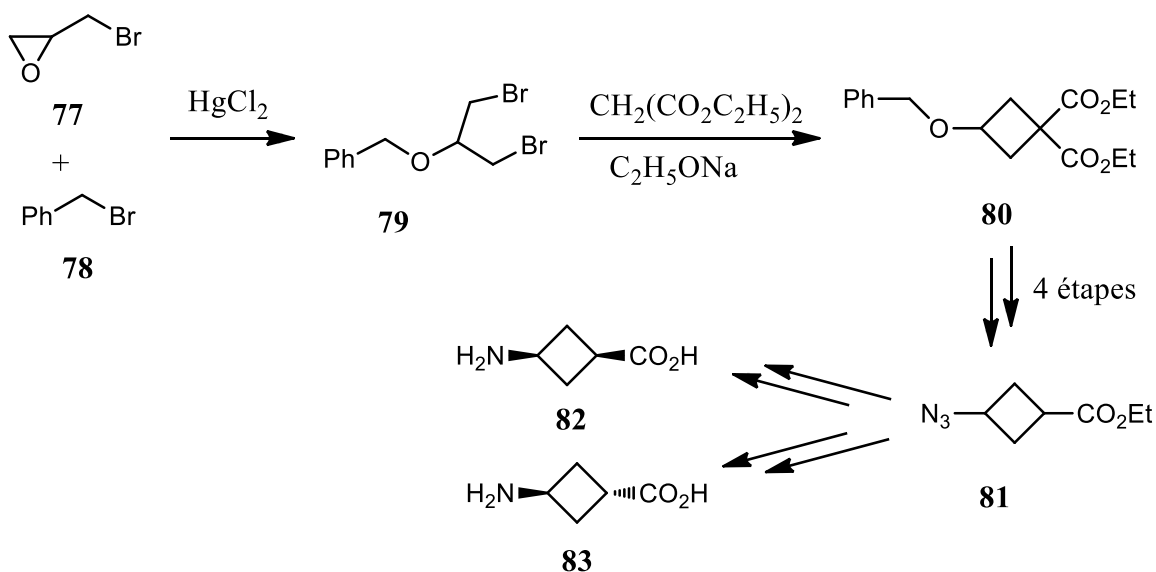


Schéma 21 : Synthèse racémique des *cis* et *trans* α,γ -méthano-GABA.

La synthèse⁵⁴ d'un dérivé de l'acide 3-amino-2,2-diméthylcyclobutanique **85** sous forme énantiopure a été publiée en 1997 en 6 étapes à partir de l'(+)- α -pinène comportant déjà un cycle à 4 chaînons (**Schéma 22**). Celui-ci a subi une oxydation allylique pour donner la verbenone, qui

par clivage oxydatif a donné le cétoacide cyclobutanique **84** précurseur de l'acide aminé protégé **85**.

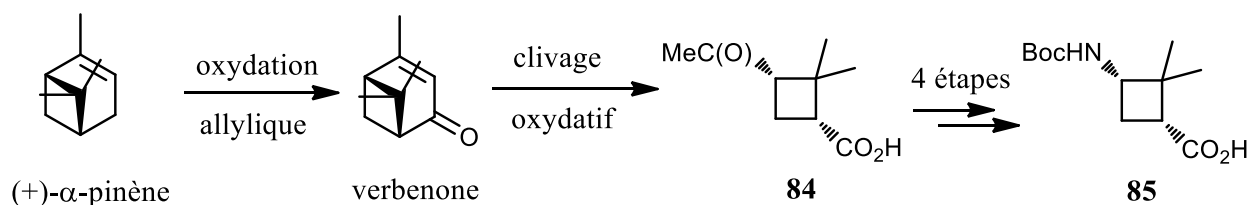


Schéma 22 : Synthèse d'un dérivé de l'acide 3-amino-2,2-diméthylcyclobutanique sous forme énantiopure.

iii- Les γ -aminoacides cyclopentaniques :

La littérature a décrit la synthèse de quelques dérivés d'acide $\gamma^{2,3}$ -aminocyclopentanique. Le *cis*- γ -aminoacide cyclopentanique (–)-**88** a été synthétisé par Ley et coll.⁴³ en 2002 par l'intermédiaire d'une estérase sur support, suivant la même voie de synthèse utilisée pour les cycles à 3 et 4 (**Schéma 23**). Ainsi, le diester cyclopentanique **86** a été désymétrisé par hydrolyse, puis a subi une réduction, une substitution nucléophile pour accéder à l'acide aminé correspondant (–)-**88**.

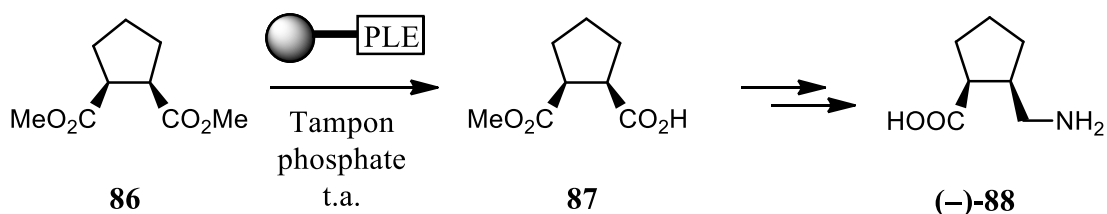


Schéma 23: Dérivé cyclopentanique *cis* $\gamma^{2,3}$ -substitué.

Le *trans*- γ -aminoacide cyclopentanique (–)-**92** a été décrit par Gellman et coll.⁵⁵ en 2011. Il a été obtenu à partir du cyclopentane-1-carboxaldéhyde **89** par réaction d'addition de Michael avec du nitrométhane en présence d'un dérivé chiral de la pyrrolidine **90**, de 2,4,6-collidine et d'acide benzoïque, puis réduction par NaBH₄. Le nitroalcool **91** obtenu a été réduit par du Nickel de Raney, puis protégé par le groupement Boc, et enfin oxydé par le réactif de Jones pour fournir l'acide aminé (–)-**92** (**Schéma 24**).

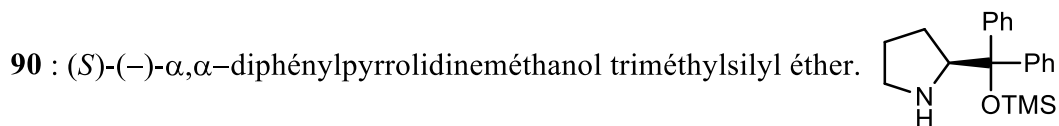
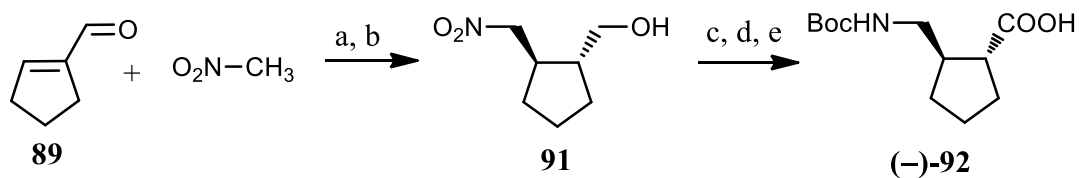


Schéma 24 : a) **86**, PhCO_2H , 2,4,6-collidine, EtOH, t.a. ; b) NaBH_4 , MeOH, 0 °C ; c) Raney Ni, 40 psi H_2 ; Boc_2O , *i*Pr₂EtN, CH_2Cl_2 , t.a ; d) $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, acétone, 0 °C à t.a.

Les acides $\gamma^{3,4}$ -aminocyclopentaniques *cis* et *trans* racémiques ont été décrits en 1982 par Westwood.⁴⁶ L'oxime a été hydrogénée en présence d'oxyde de Platine pour donner le *cis*-lactame (\pm)-**94** avec le *trans*-aminoester (\pm)-**96**. L'hydrolyse de ces produits a fourni le *cis* et le *trans*-aminoacides (\pm)-**95** et (\pm)-**97** (**Schéma 25**).

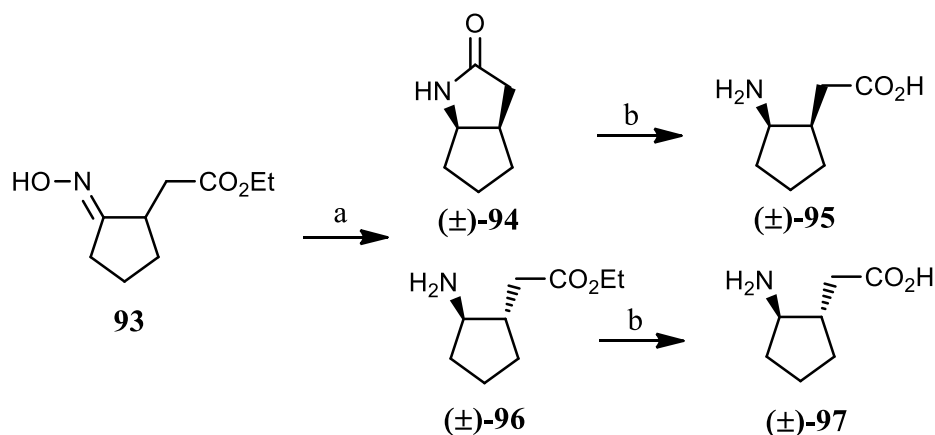


Schéma 25 : a) i- H_2 , PtO_2 , HCl, EtOH, ii- chauffage ; b) NaOH aq, EtOH.

Walker et coll :⁵⁶ ont obtenu les *trans* aminoacides cyclopentaniques racémiques (\pm)-**97** en 1998, à partir de la cétoester **98**, en faisant une amination réductive avec de la benzylamine, suivie d'une hydrogénolyse catalytique (**Schéma 26**).

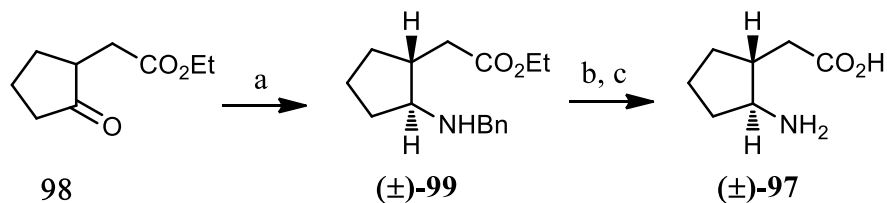


Schéma 26 : a) BnNH_2 , $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, AcOH, CH_2Cl_2 ; b) H_2 , Pd/C, EtOH ; c) NaOH, MeOH, HCl.

Une synthèse du dérivé *cis* **95** sous forme énantiopure a été décrite par Frahm en 1988,⁵⁷ à partir du cétoester **98** par condensation avec la (*R*)- ou (*S*)-phényléthylamine pour donner l'imine **100**, suivie par une réduction et une hydrolyse (Schéma 27).

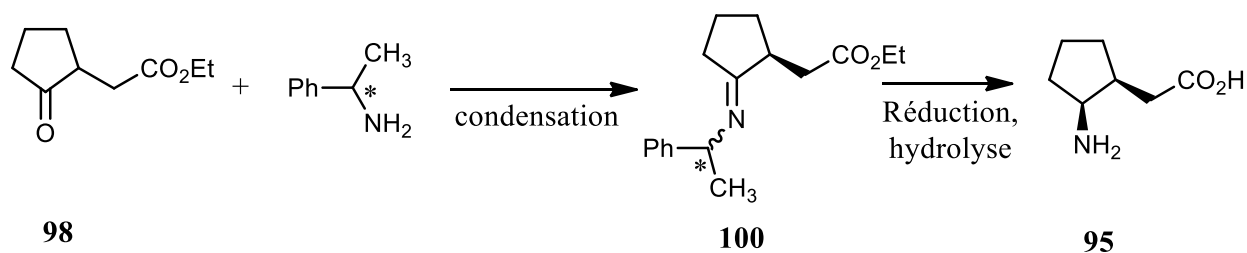


Schéma 27 : Synthèse asymétrique du γ -aminoacide cyclopentanique *cis* **95**.

Dans la littérature sont aussi décrites plusieurs synthèses d'aminoacides cyclopentaniques α,γ -substitués énantio-pures, parmi lesquelles une synthèse récente du composé **100** décrite par Granja et coll.⁵⁸ (Schéma 28). Le composé commercial de départ **101** (lactame Vince) a subi une hydrogénation, une hydrolyse avec HCl aq puis une protection de la fonction amine par le groupement Boc pour donner l'acide 3-aminocyclopentanique *N*-protégé **102** racémique. La séparation des deux énantiomères a été effectuée par cristallisation en présence de (*S*)- ou (*R*)-phényléthylamine.

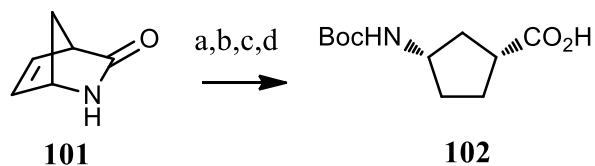


Schéma 28 : a) H₂, Pd/C, MeOH ; b) HCl (10%) ; c) Boc₂O, DIEA (diisopropyléthylamine), H₂O/dioxane ; d) (*R*)-phényléthylamine, CHCl₃/hexane

iv- Les γ -aminoacides cyclohexaniques

Gellman et coll.⁵⁹ ont réalisé la synthèse des composés **106** et **108** énantio-pures (Schéma 29). Une addition 1,4 du nitrométhane sur le 1-cyclohexène carboxaldéhyde en présence d'un dérivé chiral de la pyrrolidine **A** et d'acide benzoïque, suivie d'une réduction immédiate des γ -nitroaldéhydes obtenus, a conduit aux γ -nitroalcools *cis*-**103** et *trans*-**104**. Les deux diastéréoisomères **103** et **104** inséparables ont subi ensemble une oxydation de Jones pour donner quantitativement deux γ -nitroacides *cis*-**105** et *trans*-**107** (majoritaire) séparables par chromatographie et cristallisation. La réduction de ces composés puis la protection de la fonction amine a conduit aux γ -aminoacides *N*-protégés *cis*-**106** et *trans*-**108**.

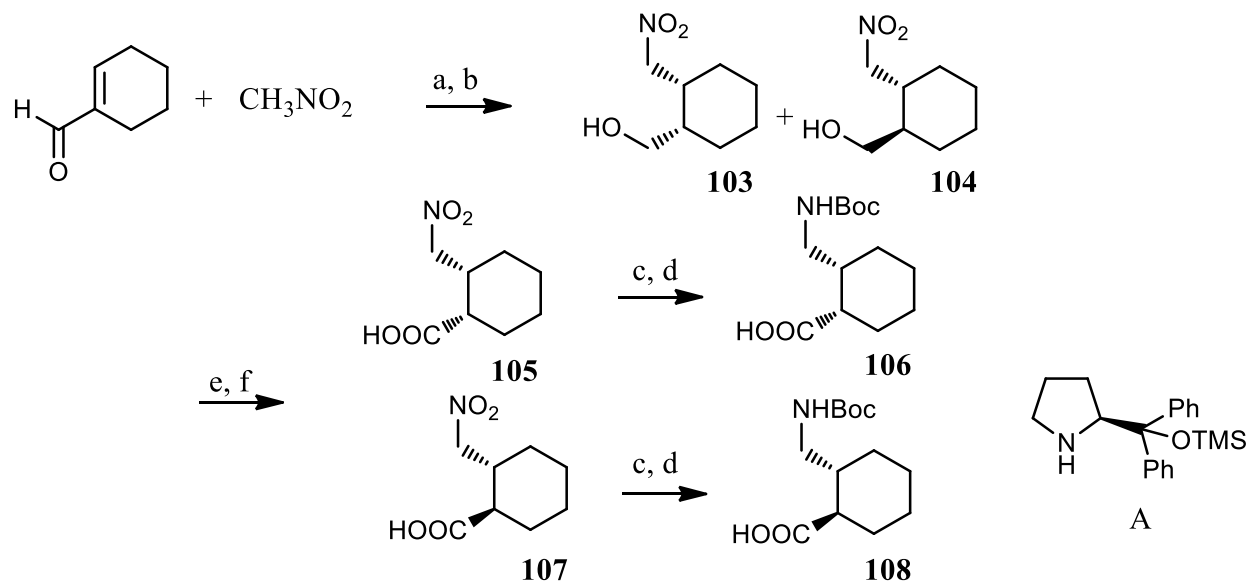


Schéma 29 : a) **A**, acide benzoïque ; b) NaBH_4 , MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C}$; c) H_2 , Pd/C ; d) TMSCl, Boc_2O , DIEA ; e) $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; f) Chromatographie.

Suivant un processus similaire,⁶⁰ l'addition 1,4 d'un aldéhyde sur la nitrocyclohexène, en présence de la pyrrolidine **A** et d'un cocatalyseur acide suivie de la réduction, a donné le nitroalcool correspondant **109** majoritaire avec un excès énantiomérique de 99 %. Celui-ci a été oxydé par la suite pour donner le nitroacide **110**, qui après réduction et protection du groupement amine, a donné le *cis*- γ -aminoacide *N*-protégé **111**. Le nitroalcool **109** a subi une épimérisation pour donner le dérivé *trans*, qui a conduit à la formation du *trans*- γ -aminoacide *N*-protégé **114** correspondant (Schéma 30).

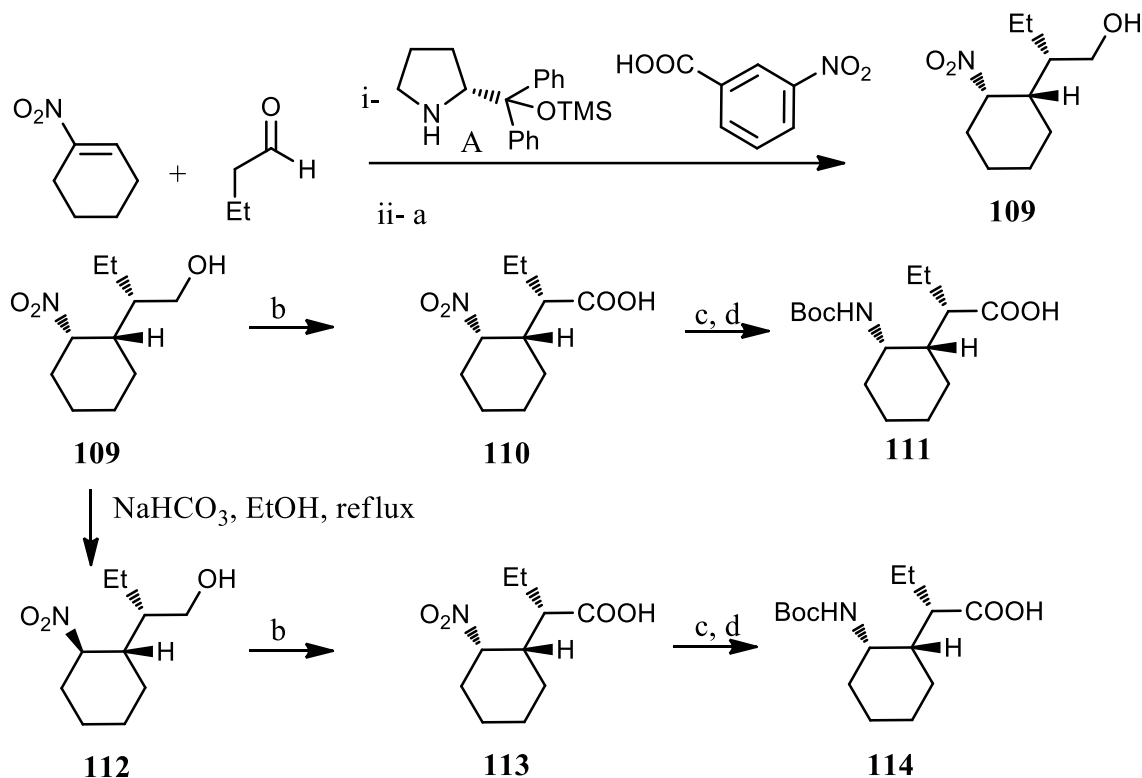


Schéma 30 : a) NaBH_4 , MeOH, 0 °C ; b) $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; c) H_2 , Ni Raney ; d) TMSCl, Boc_2O , DIEA.

Granja et coll.⁵⁸ se sont intéressés à la synthèse de γ -aminoacides cyclohexaniques α,γ -substitués. Ainsi l'isomère *cis* de l'acide 3-aminocyclohexanique **116** ((*L*)-Boc- γ -Ach-OH) a été obtenu en trois étapes à partir de l'acide 3-nitrobenzoïque **115** (**Schéma 31**). Le composé **115** subit une réduction du groupement nitro et du cycle aromatique en présence de Nickel de Raney sous pression d'hydrogène (100 bar) à 150 °C puis une protection du groupement amine. La séparation des deux énantiomères a été effectuée par cristallisation en présence (*R*)-phényléthylamine.

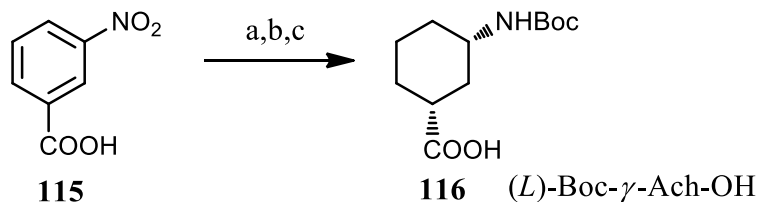


Schéma 31 : a) H_2 (100 atm). Raney Ni, NaOH, H_2O , 150 °C ; b) $(\text{Boc})_2\text{O}$, DIEA (diisopropyléthylamine), H_2O /dioxane ; c) (*R*)-phényléthylamine, CHCl_3 /hexane.

II- Les γ -aminoacides dans les peptides

A- Les peptides naturels

Des γ -aminoacides substitués ou non ont été trouvés dans des peptides naturels linéaires ou cycliques. Un γ -peptide a été rapporté par Hanby et Rydon en 1946.⁶¹ Ils ont montré que la capsule (enveloppe qui entoure la paroi d'une bactérie) de la *Bacillus anthracis* était composée d'un γ -peptide fait d'un enchaînement de plusieurs motifs acide *D*-glutamique, liés entre eux par une liaison peptidique entre la fonction amine et l'acide carboxylique en γ (**Figure 9**).

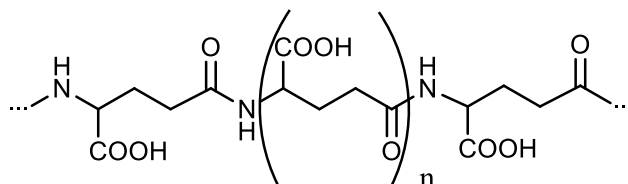


Figure 9 : Poly- γ -acide-*D*-Glutamique.

Les imacidines A-E sont des peptides naturels isolés à partir des *Streptomyces olivaceus*. Les études ont montré la présence d'un γ -aminoacide non substitué (γ Abu ou GABA) enchaîné avec des α -aminoacides, dans un segment peptidique linéaire (**Figure 10**).⁶²

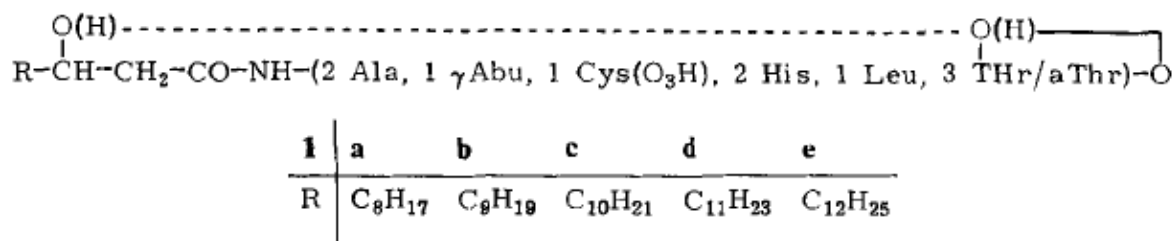


Figure 10 : Imadicines A-E (1a-e) contenant un γ -aminoacide (γ Abu).⁶²

Les unguisines A-C (**Figure 11**) sont des heptapeptides cycliques isolés d'un champignon marin, l'*Emericella unguis*.⁶³ Il semble à ce jour que ces composés soient les seuls peptides cycliques naturels contenant un résidu GABA. L'unguisine A a été synthétisé par Hunter et Chung⁶³ qui ont pu ainsi confirmer sa structure.

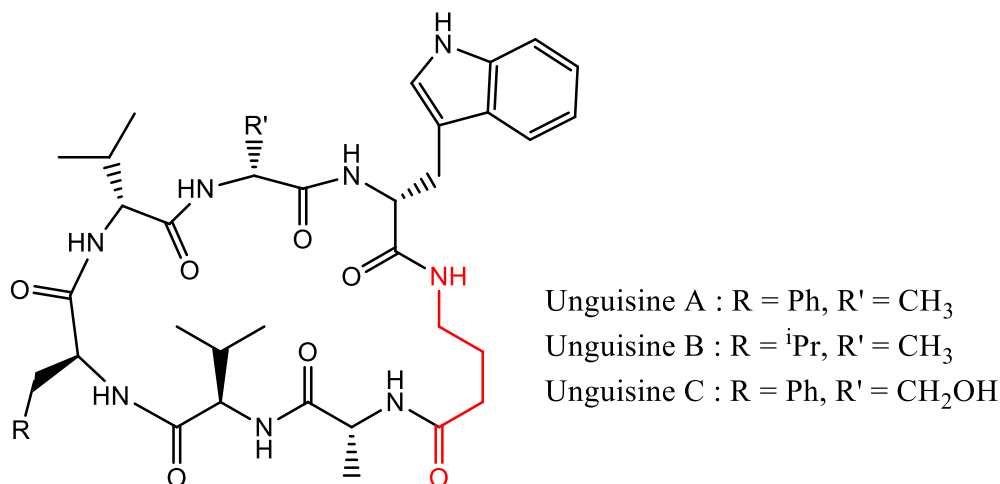


Figure 11 : Les unguisines A-C contenant le GABA.

Les cyclothéonamides A et B sont des peptides cycliques isolés de l'éponge marine Japonaise *Theonella swinhoei*. De même, ces peptides contiennent un γ -aminoacide substitué (tyrosine vinylique).⁶⁴ D'autres cyclothéonamides (C-E) ont été isolés après, à partir d'extraits de la *Theonella swinhoei*, et contiennent soit une tyrosine vinylique soit une tyrosine déshydrovinylique (**Figure 12**). Ces cyclothéonamides sont des inhibiteurs de la thrombine (serine protéase).^{65,66}

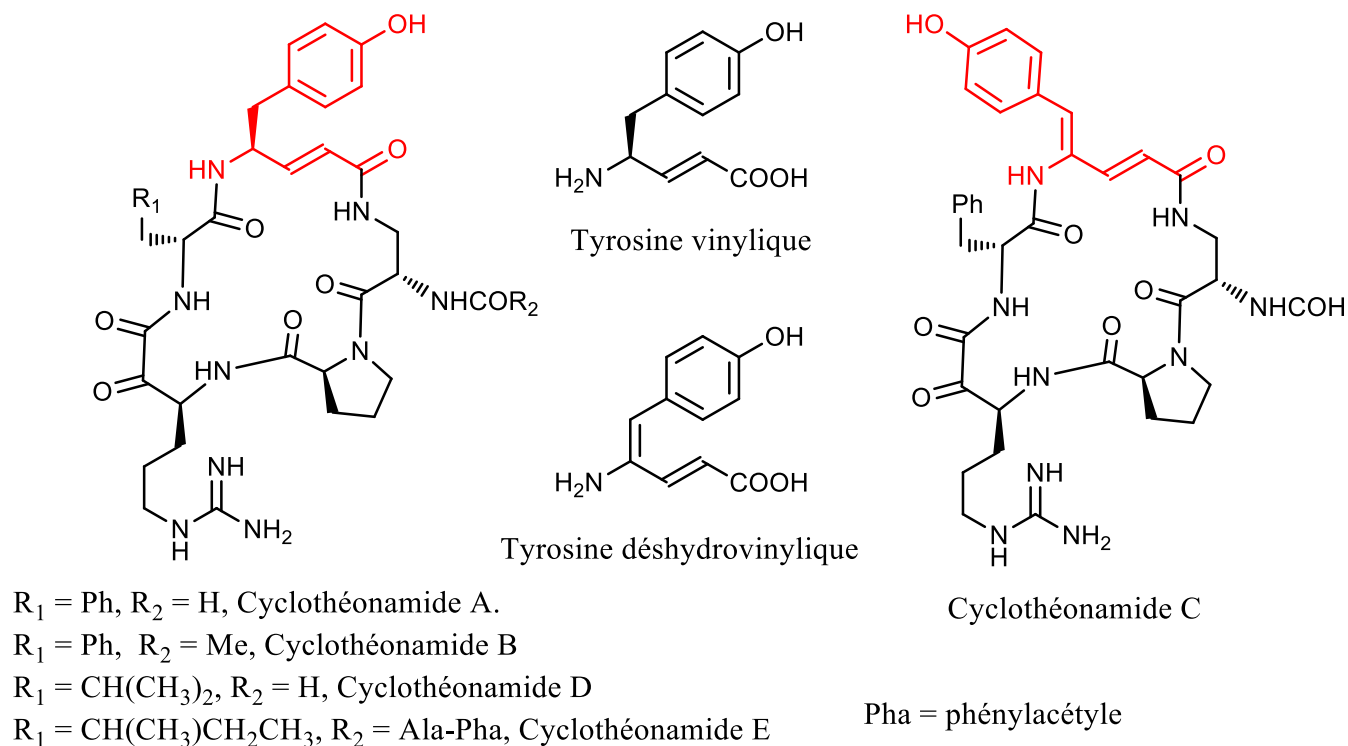


Figure 12 : Cyclothéonamides A-E contenant un γ -aminoacide substitué.

Les microscérodermines A et B sont de même des peptides cycliques contenant un β -hydroxy- γ -aminoacide (GABOB). Ces peptides antifongiques ont été isolés à partir de l'espèce marine *Microscleroderma* (**Figure 13**).⁶⁵

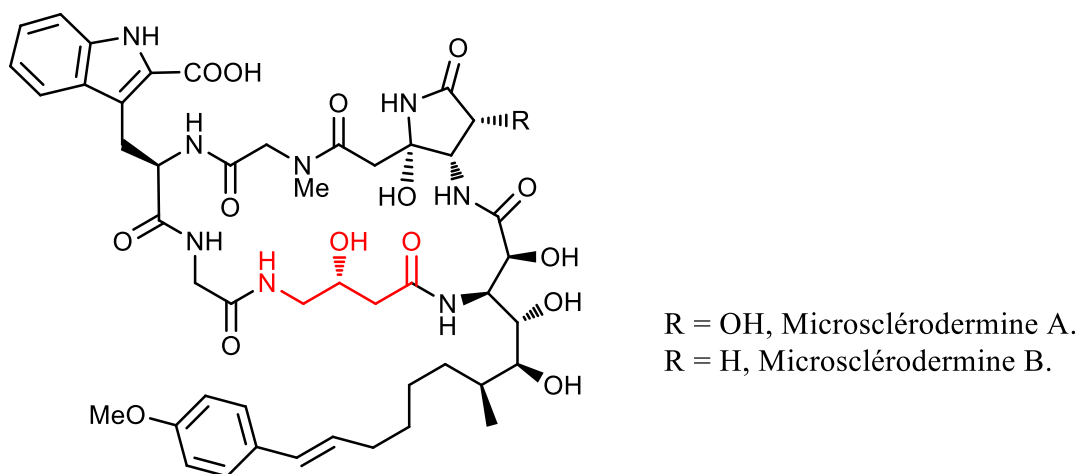


Figure 13 : Microscérodermines A et B contenant un β -hydroxy- γ -aminoacide.

B- Les peptides non-naturels

La chimie peptidomimétique a évolué au cours des années, et la diversité des oligomères synthétiques s'est accru d'une façon exponentielle quand les chercheurs ont utilisé les aminoacides homologués comme les β -aminoacides pour mimer les α -peptides.^{67,68} La stabilité structurale et protéolytiques des β -peptides a poussé les chercheurs à exploiter ces propriétés chez leurs homologues γ -peptides. Ainsi, la stabilité protéolytique de cinq γ -peptides a été testée pour la première fois en 2001 par l'équipe de Seebach avec 15 peptidases. Aucune dégradation n'a été observée après 48 h tandis que les α -peptides communs ont été dégradés en 15 min.⁶⁹ D'autre part, une structuration en hélice 14 a pu être observée par les auteurs sur le γ -peptide B (**Figure 14**).

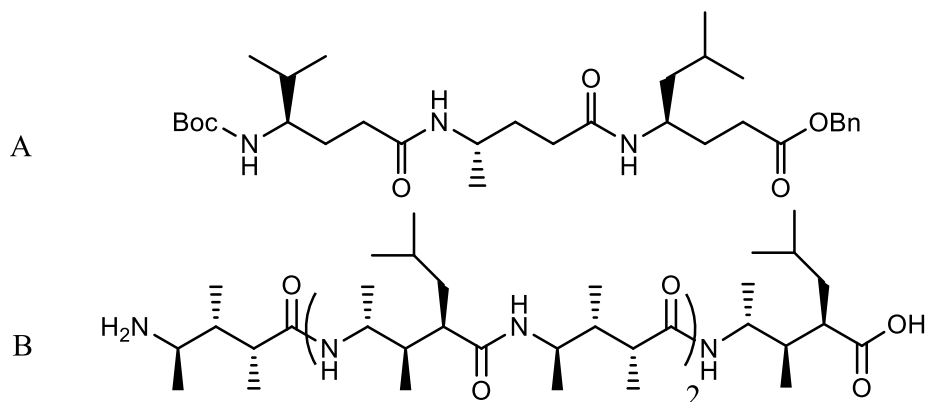


Figure 14 : Deux γ -peptides A et B (parmi d'autres) testés pour leur stabilité envers les enzymes protéolytiques.

De plus, une grande variété de γ -peptides devient accessible due aux plus grandes possibilités d'introduire des substituants sur la chaîne carbonée des γ -aminoacides. Or, la présence de deux atomes supplémentaires chez les γ -aminoacides par rapport à leurs analogues α - augmente normalement le degré de liberté et la flexibilité de leurs peptides, ce qui défavorise la formation de structures repliées stables. Les études conformationnelles des α - peptides sont décrites par deux angles de torsion : ϕ (entre N-C $^\alpha$) et ψ (C $^\alpha$ -CO).⁷⁰ Avec l'introduction d'un carbone supplémentaire, un troisième angle de torsion θ (C $^\beta$ -C $^\alpha$) est ajouté pour les β - peptides. Alors que pour les γ -peptides, deux angles de torsion θ (C $^\gamma$ -C $^\beta$) et ζ (C $^\beta$ -C $^\alpha$) sont ajoutés (**Figure 15**).²¹

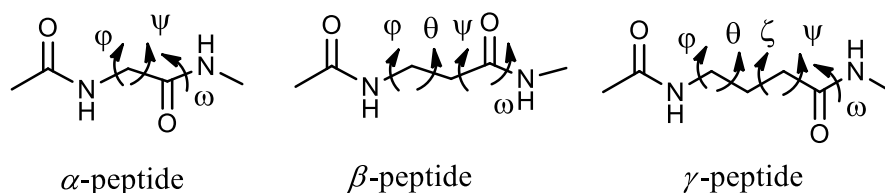


Figure 15 : Les différents angles de torsion dans un peptide.

Cependant, les études conformationnelles des γ -peptides ont montré que ceux-ci peuvent aussi adopter des structurations secondaires stables.^{71,72} Les modes de repliements trouvés chez les γ -peptides ressemblent à ceux trouvés dans les peptides naturels. Ils sont déterminés par les préférences conformationnelles de chaque résidu grâce aux interactions non-covalentes entre les atomes, comme les liaisons-hydrogène, liaisons ioniques et dipôle-dipôle. Ainsi, des hélices, des feuillets ou des coudes peuvent être obtenus comme pour les α -peptides.

Seebach et coll. ont synthétisé un $\gamma^{2,4}$ -dipeptide qui se structure en « β -turn » selon la chiralité des substituants.⁷³ Cette structuration a permis de synthétiser les γ -peptides (a-d) qui peuvent mimer la Somatostatine, une hormone cyclique constituée de 14 aminoacides qui inhibe la sécrétion de l'hormone de croissance (**Figure 16**).⁷⁴

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
a	H	Bn	Bn	Me
b	Mes	Bn	H	Me
c	Mes	H	H	H
d	H	H	H	H

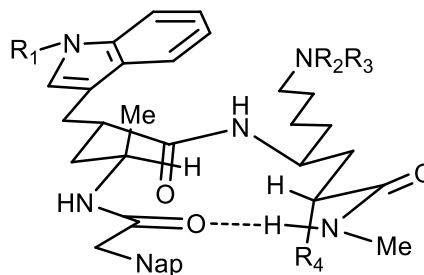


Figure 16 : Les γ -peptides ayant une affinité envers les récepteurs de la Somatostatine.

Les premières études conformationnelles sur les γ -peptides en 1998 par les équipes de Hanessian⁷⁵ et de Seebach⁷⁶ ont montrées que la plus grande flexibilité des squelettes des γ -aminoacides n'empêche en rien une structuration secondaire. Hofmann et coll. ont effectué une étude théorique par modélisation moléculaire sur un γ -hexapeptide modèle non substitué. Pour cela, il a restreint la valeur de l'angle de torsion ω à -165° , 180° et 165° . Il a ainsi pu obtenir un éventail de structures hélicoïdales de plus basse énergie. Cette étude présente les différents types d'hélices que pourrait former un γ -peptide, avec des valeurs correspondantes pour chacun des angles de torsion ϕ , θ , ζ et ψ .⁷⁷

Les premiers exemples de γ -peptides ont été publiés en 1998 par Hanessian, qui a préparé un tetra, un hexa, et un octamère γ^4 - ainsi que des $\gamma^{2,4}$ -substitués. Des analyses en RMN-2D ont montré que ces peptides dérivés de la *L*-alanine et *L*-valine homologuées, forment des hélices-14. Hanessian et col. ont ainsi montré que cette structuration en hélice se met en place dès le tetrapeptide. La configuration absolue du carbone α semble aussi avoir de l'importance puisque à l'inverse des peptides (α,S)-substitués, le peptide (α,R)-substitués ne se structure pas en hélice (**Figure 17**).⁷⁵

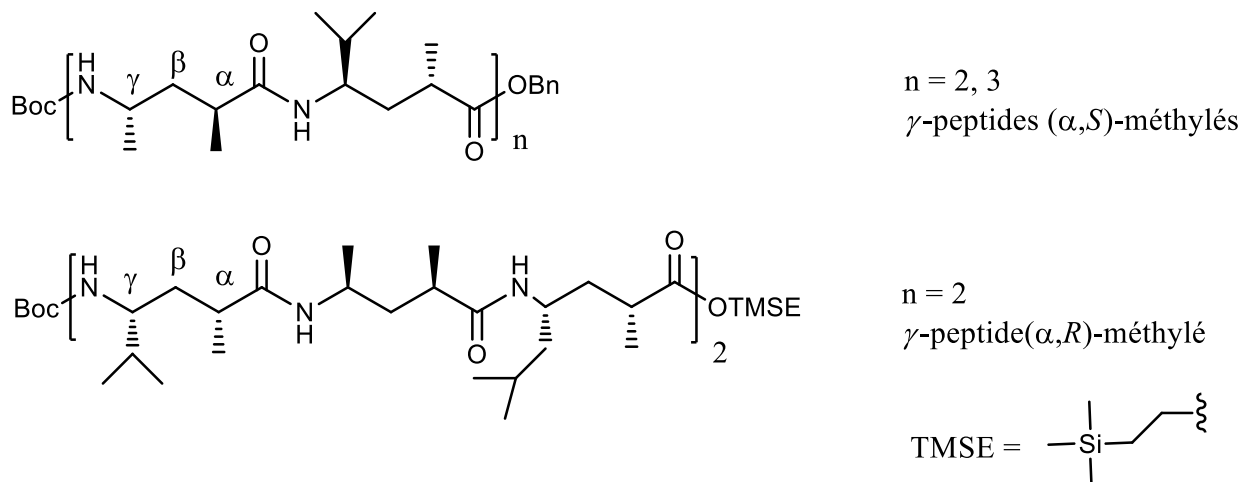


Figure 17 : Des $\gamma^{2,4}$ - peptides (α,S)- et (α,R)-méthylés

Au même moment, l'équipe de Seebach a observé une structuration en hélice avec un γ^4 -hexapeptide analogue au $\text{H}-[\gamma\text{Val}-\gamma\text{Ala}-\gamma\text{Leu}]_2\text{-OH}$.⁷⁶ Les analyses montrent que pour qu'une hélice puisse se former, les chaînes latérales doivent être positionnées perpendiculairement à l'axe de l'hélice, et les liaisons $\text{C}=\text{O}$ et NH (plan de l'amide), doivent être parallèles à l'axe de l'hélice.

Kunwar et coll. ont observé une structuration en hélice-9 dans le CDCl_3 pour un γ -peptide mixte, formé d'une alternance de γ^4 -aminoacide sucre (SAA) et de GABA (**Figure 18**).⁷⁸ L'utilisation des aminoacides sucres introduit une polyfonctionnalité des peptides, ainsi qu'une restriction conformationnelle.⁷⁹

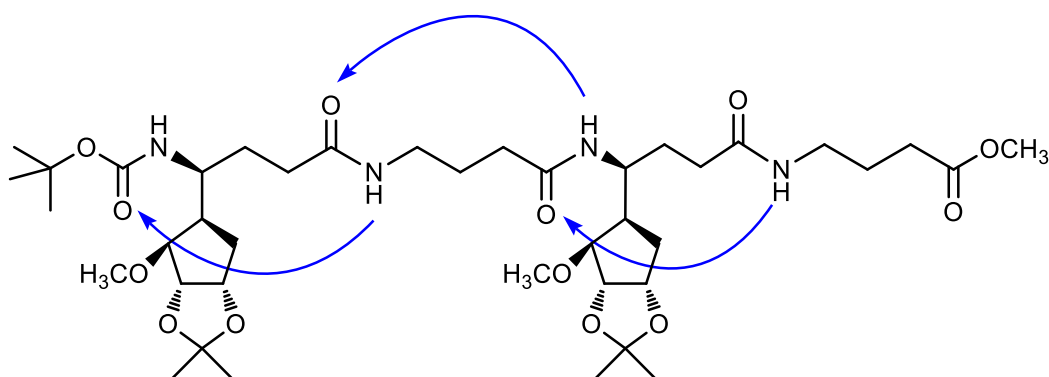


Figure 18 : Structuration en hélice-9 pour un γ^4 -peptide. Les liaisons hydrogène sont indiquées en bleu.

Balaram et coll. ont élaboré des oligomères de Gabapentin (Gpn) et ont pu mettre en évidence la formation de structure en ruban C-9 (**Figure 19**).⁸⁰

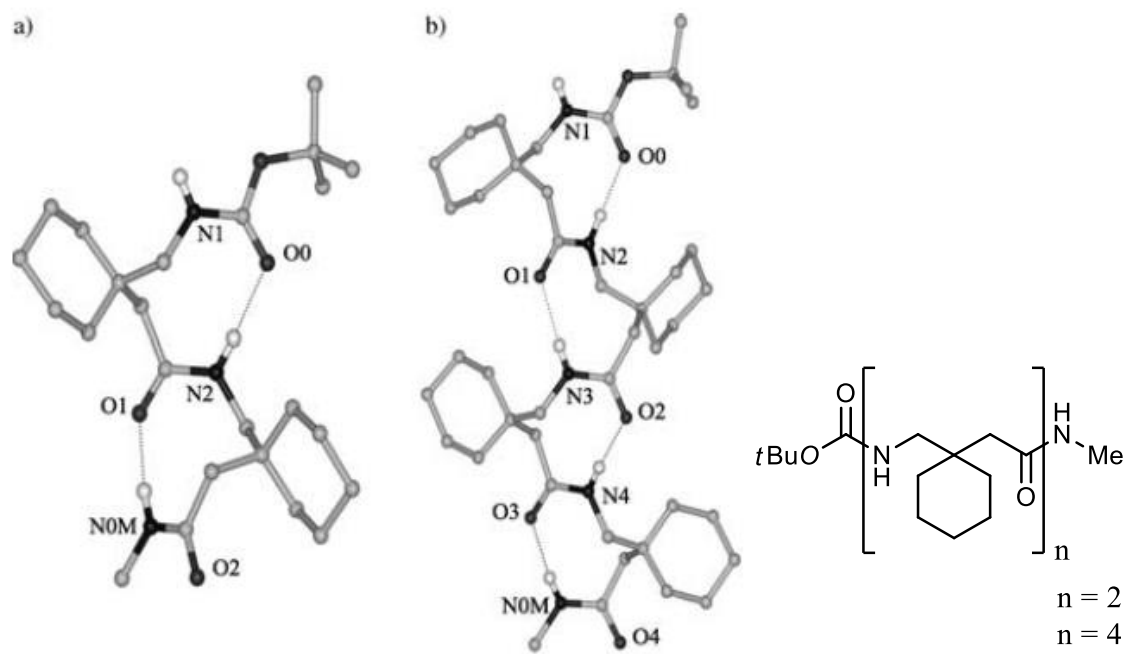


Figure 19 : Structure RX de a) Boc-Gpn-Gpn-NHMe et b) Boc-Gpn-Gpn-Gpn-Gpn-NHMe ; les liaisons hydrogène intramoléculaires sont représentées par des pointillés.⁸⁰

Cela montre que la substitution en position C β a limité le degré de liberté de la chaîne et a favorisé le repliement.

Ces résultats montrent que les γ -peptides peuvent eux aussi adopter des structures secondaires, type coude, hélice ou ruban. L'augmentation de la chaîne de 2 atomes de carbones par rapport à celle d'un α -peptide, permet l'accès à des structures non observées sur les α - ou les β -peptides.

Afin de favoriser une structuration secondaire des γ -peptides, il est possible de figer un ou plusieurs angles de torsion de la chaîne carbonée des γ -aminoacides (**Figure 20**). L'introduction d'un cycle sur cette chaîne est un moyen d'obtenir des γ -aminoacides à structures contraintes qui a été très peu exploré. On trouve dans la littérature quelques exemples de γ -peptides formés à partir de γ -aminoacides à squelette contraint par des cycles à 3, 4, 5 ou 6 chaînons.

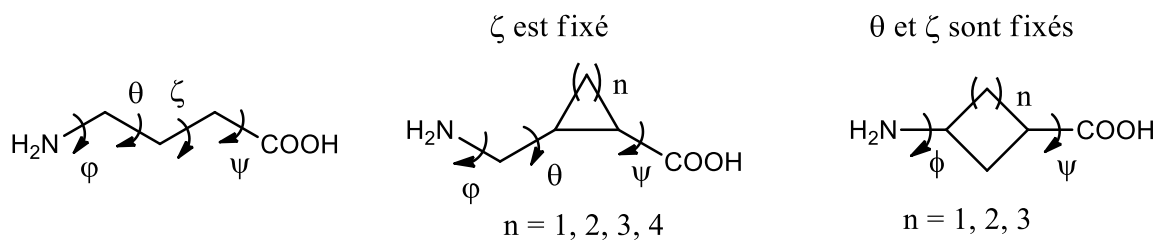


Figure 20 : Influence d'un cycle sur les angles de torsion d'un γ -aminoacide.

1- Les dérivées cycliques à six chaînons :

Gellman et coll. ont exploré le comportement des homo-oligomères de $\gamma^{3,4}$ -aminoacides, et ils ont trouvé que ces derniers se structurent en hélice en faisant des interactions $C=O(i)\cdots H-N(i+3)$ de type liaison-hydrogène avec des pseudo-cycles en C-14, ainsi que des interactions formant des pseudo-cycles en C-9 (**Figure 21**).⁸¹

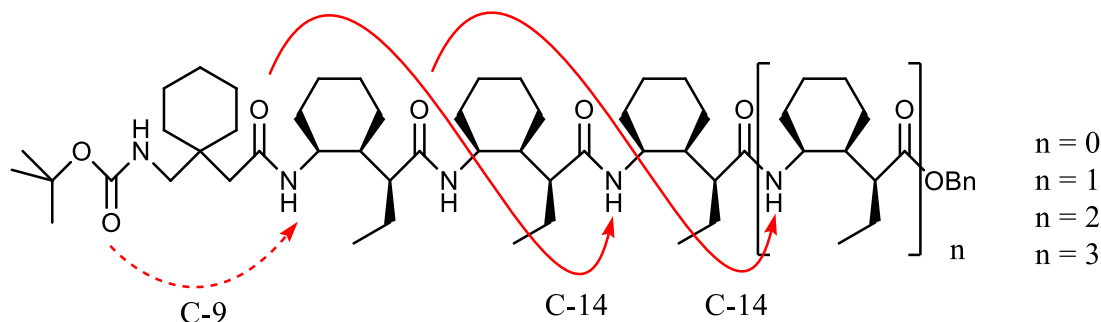


Figure 21 : Un homo-oligomère à base de $\gamma^{3,4}$ -aminoacides cyclohexaniques et les liaisons hydrogène (en rouge) impliquant la formation d'hélice-14, et celle formant un pseudo-cycle en C-9.

2- Les dérivées cycliques à cinq chaînons :

Gellman et coll. ont préparé des γ -peptides d'acide *trans*-3-aminocyclopentanique (ACPC) reliés par une unité *D*-prolyl-(1,1-diméthyl)-1,2-diaminoéthyle. Ces oligomères ont présenté un arrangement spatial en « épingle » à l'état solide (**Figure 22**). Ils ont ainsi montré qu'un lien non-peptidique peut permettre l'organisation en feuillets parallèles de 2 résidus γ -peptides.⁸²

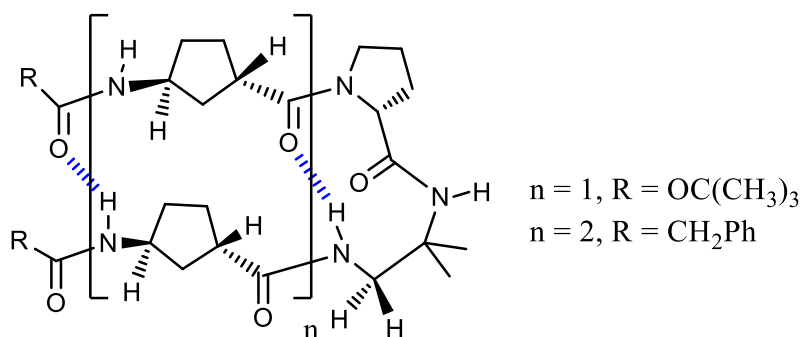


Figure 22 : Structures en épingle des oligomères du *trans*-3-ACPC.

Une série d'hexa γ -peptide formés à partir de *cis*- γ -amino-*L*-proline a été synthétisée par l'équipe de Royo. Parmi ceux-ci, l'oligomère *N*-acétylé a montré une structuration secondaire en ruban. L'étude de ce composé par RMN a pu mettre en évidence des interactions intramoléculaires conduisant à la formation de pseudo-cycles en C₉ (**Figure 23**).⁸³

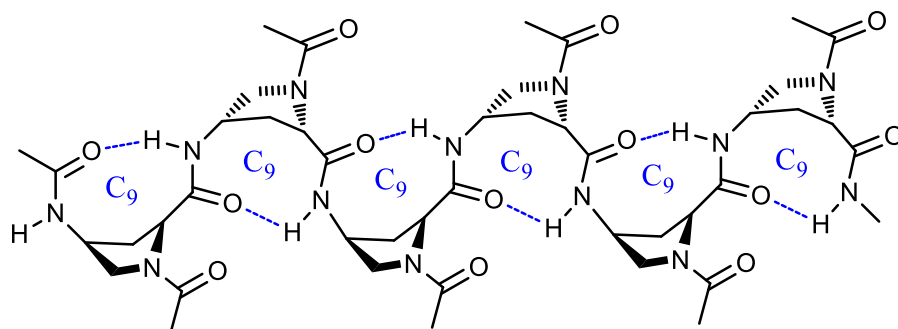


Figure 23 : Structuration en ruban C-9 des γ -peptides de N ^{α} -acétyl cis- γ -amino-L-proline.

Smith et coll. ont utilisé des γ -aminoacides rigidifiés par un 2,3-*trans*-dioxolane pour la synthèse de tétra et hexa- γ -peptides. L'utilisation d'un système cyclique de dioxolane au lieu d'un cyclopentane a été envisagée pour simplifier l'approche synthétique et faciliter l'analyse du spectre RMN. Une première série d'oligomères a été formée à partir de γ -aminoacides de même configuration (A). La deuxième série était formée d'une alternance des énantiomères de ces γ -aminoacides -[(*R,R*)-(*S,S*)]-_n (B). Des analyses en RMN de proton leur ont permis de mettre en évidence pour les deux séries, la formation de cycle en C₇ par une liaison hydrogène entre le NH et le CO d'un même résidu γ -aminoacides (**Figure 24**).⁸⁴

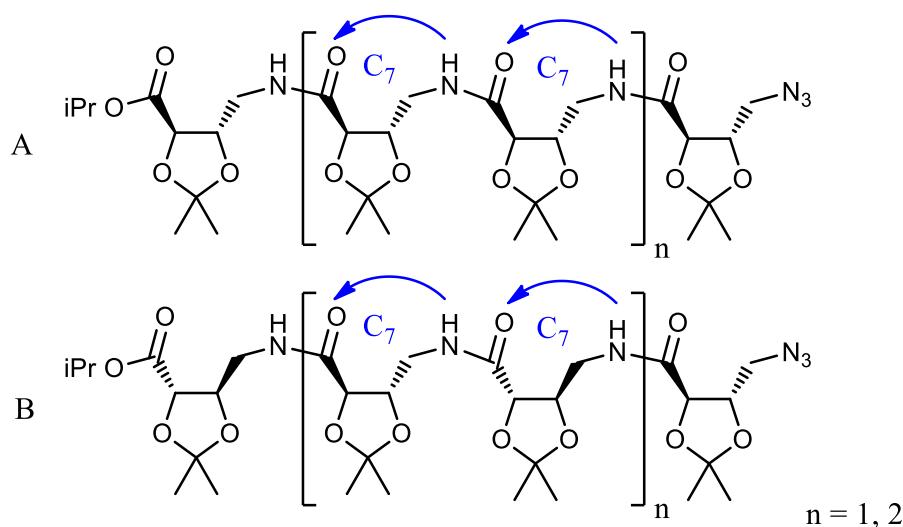


Figure 24 : γ -peptides à base de 2,3-*trans*-dioxalane structurés en ruban.

Fleet et coll.⁸⁵ ont utilisé un autre type de γ -aminoacide sucre (SAA) synthétisé à partir du *L*-arabinose dans un oligomère. Ils ont trouvé une structuration en coude à l'état solide chez un dipeptide à base de β -hydroxy γ -azido esters (**Figure 25**).

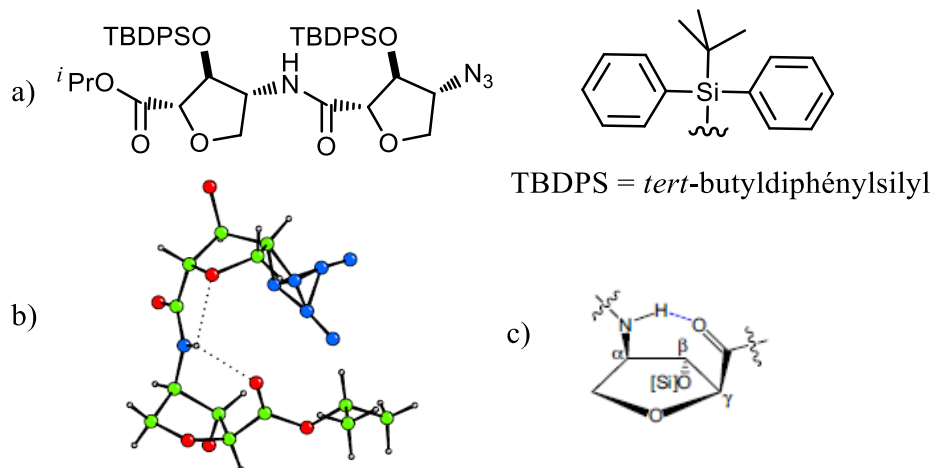


Figure 25 : a) γ -dipeptides à base de β -hydroxy γ -azido esters ; b) conformation du dimère à l'état solide par diffraction au rayon-X ; c) structuration en coude du dimère.⁸⁵

3- Les dérivés cycliques à quatre chaînons :

Ortuño et coll. ont préparé des homo et hétéro- γ -dipeptides à partir des deux énantiomères de l'acide 3-amino-2,2-diméthylcyclobutanique.⁸⁶ Ils ont ensuite préparé des hétéro- γ,γ -hexapeptides afin d'étudier leur structuration.⁸⁷ Ces γ,γ -peptides hybrides ont été préparés en alternant un énantiomère ou l'autre de l'acide 3-amino-2,2-diméthylcyclobutanique (**Figure 26 A et B**) avec la *cis* 4-amino-*L*-proline. Des analyses RMN sur ces peptides ont pu mettre en évidence trois types de liaison hydrogène intramoléculaire conduisant tous à la formation de pseudo-cycle à 7 chaînons (**Figure 26 C et D**). Ces γ -peptides hybrides présentent aussi une structuration en vésicules lorsqu'ils sont mis en solution dans le MeOH. Les vésicules ont pu être observées en microscopie électronique en transmission (MET) (**Figure 27**).

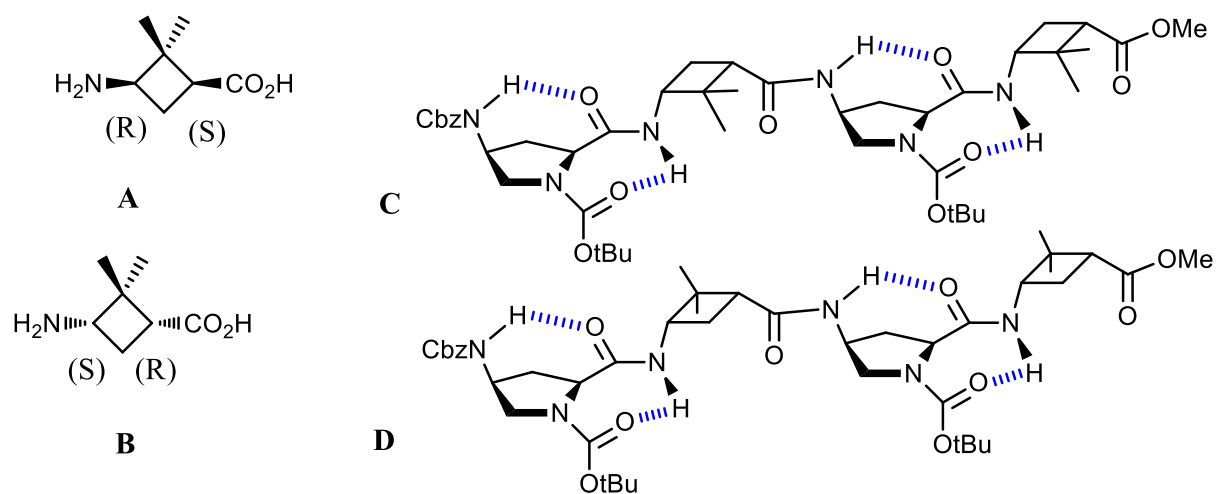


Figure 26 : Dérivés cyclobutanique de γ -aminoacides **A** et **B**, γ,γ -peptides hybrides **C** et **D**. Les liaisons hydrogène sont montrées en bleu.

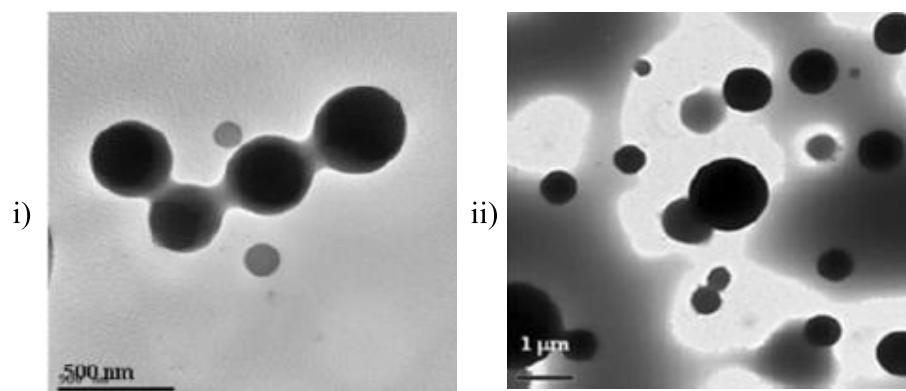


Figure 27 : Image en MET des vésicules formées par les tetrapeptides **C** i) et **D** ii) dans des solutions à 2 mM dans du MeOH.⁸⁷

En 2012, Ortuño et coll.⁸⁸ ont testé ces peptides hybrides (première génération **A**) comme agent de pénétration dans les cellules (Cell-Penetrating Peptides = CPP). Les CPP peuvent être un moyen de transport des médicaments dans les cellules. Pour cela, une déprotection de l'amine a été réalisée suivi de l'introduction du groupement fluorescent (5(6)-carboxyfluorescein = CF) à la place du Boc. Ensuite, une deuxième génération (**B**) d'hexapeptides hybrides a été préparée en introduisant un groupement R' sur l'azote de la proline, dans le but d'améliorer la pénétration cellulaire des oligomères (**Figure 28**).

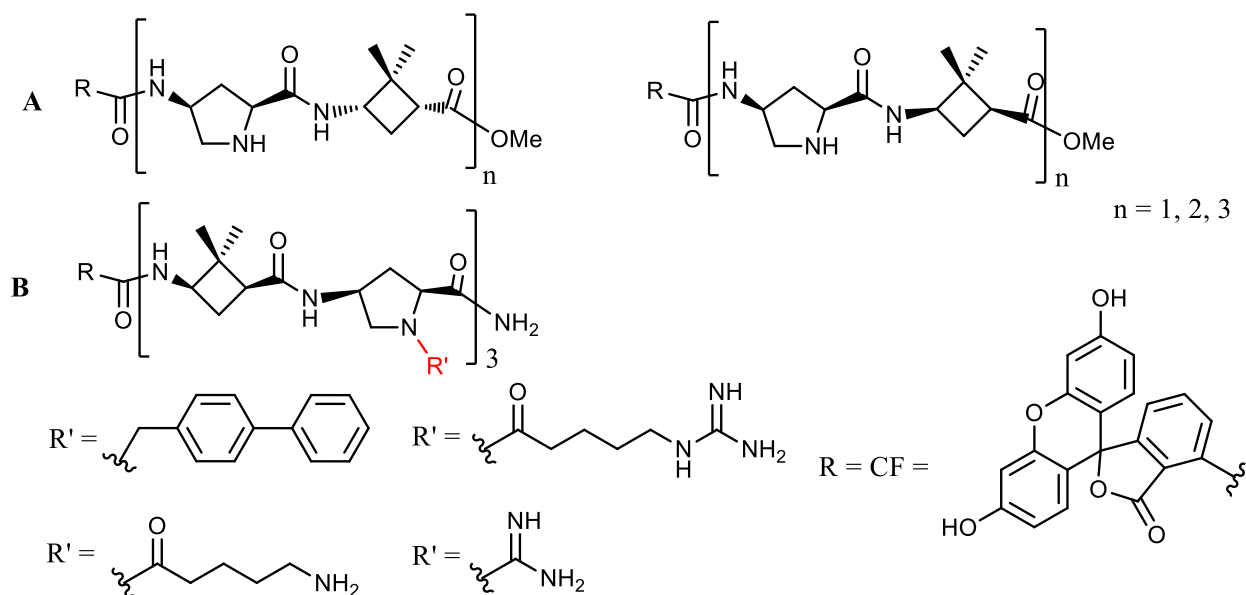


Figure 28 : γ,γ -Peptides hybrides marqués par du CF ; première génération (**A**) et quelques peptides de la deuxième génération (**B**) ayant les plus grandes capacités de pénétration dans les cellules.

Ces deux générations ont été testées sur la lignée de cellules HeLa. La génération **A** a montré de faibles capacités à la pénétration dans les cellules contrairement à la génération **B** qui interagit facilement avec les cellules HeLa.

4- Les dérivés cycliques à trois chaînons

Les exemples d'oligomères contenant des aminoacides cyclopropaniques sont eux aussi assez rares. Smith et coll.⁸⁹ ont synthétisé un tripeptide de γ -aminoacide cyclopropanique *trans* (TAMP). Les analyses de leurs structures aux rayons X montrent une organisation de ces tripeptides en feuillets parallèles avec des liaisons hydrogène N-H...O=C intermoléculaires, mais aussi des interactions à faible distance de type C-H...O impliquant le proton cyclopropanique en α du carbonyle (**Figure 29**). Ce tripeptide a montré une tendance à former un gel lorsqu'il était mis en solution dans le chloroforme à une concentration supérieure à 15 mM.

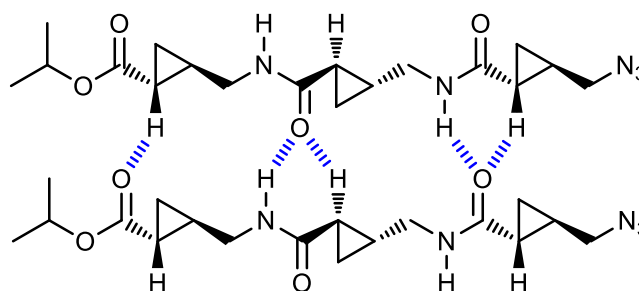


Figure 29 : Structurations en feuillets parallèles pour un tripeptide issu du *trans*- γ - aminoacides cyclopropaniques. Les liaisons hydrogène sont montrées en bleu.

Smith et coll.⁹⁰ ont ensuite employé un segment de molécule (linker) qui forme un coude, afin de lier les feuillets et stabiliser leur structure (**Figure 30**). Ce segment contient un *ortho*-aminophénol qui fige l'angle de torsion $\psi_{(i+2)}$ à une valeurs égale à celle d'un « β -turn ». De plus, le proton du *N*-aryle amide est plus acide de celui d'un amide normal par la présence du groupement trifluorométhyle en *ortho*, ce qui facilite sa participation dans une liaison-hydrogène avec le carbonyle adjacent.

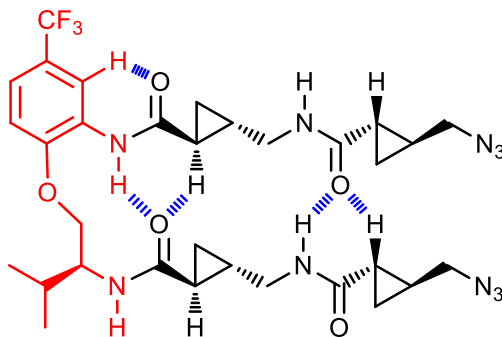


Figure 30 : β -turn stabilisant la structuration en feuillets de l'oligomère du trans- γ -aminoacides cyclopropaniques. Les liaisons hydrogène sont montrées en bleu. Le linker est montré est rouge.

C- Conclusion du chapitre

La synthèse de nouveaux dérivés à contrainte conformationnelle du GABA est d'une grande importance, puisqu'ils pourraient avoir des propriétés pharmacologiques intéressantes et des applications thérapeutiques. D'autre part, les γ -peptides peuvent adopter des structurations secondaires stables en solution. Les exemples de peptides à base de γ -aminoacides à squelette contraint sont très peu explorés, d'où l'importance de leur synthèse.

Présentation des travaux

La littérature a décrit la synthèse de plusieurs dérivés cycliques de γ -aminoacides à trois, cinq, et six chaînons et leur incorporation dans des oligomères. Très peu de travaux de recherche évoquent la synthèse énantio pure de dérivés de γ -aminoacides cyclobutaniques (**Figure 31**) :

Il existe dans la littérature une synthèse de l'acide *trans* 2-(aminométhyl)cyclobutanique (3,4 CB-GABA) en série racémique⁴⁶ et aucune en série optiquement active. De même, la synthèse de l'acide *cis*-2-(aminométhyl)cyclobutanique (2,3 CB-GABA) en série énantio pure est décrite dans la littérature^{43,49,50} alors qu'on trouve une seule synthèse racémique⁴⁷ de la forme *trans*, et une synthèse en série énantio pure.⁵¹

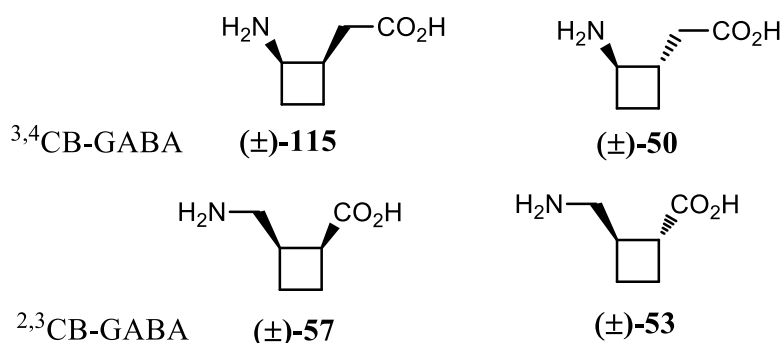


Figure 31 : Dérivés cyclobutaniques du GABA.

Compte tenu du peu de méthodes disponibles dans la littérature, le laboratoire d'accueil à Orsay s'est donné comme objectif l'élaboration de protocoles de synthèse de tous les stéréoisomères du 3,4 CB-GABA et du 2,3 CB-GABA. Les synthèses de *cis*- et de *trans*- 2,3 CB-GABA optiquement purs ont déjà été établies et ont été publiées récemment.^{50,51}

Dans ce travail, nous reporterons la mise au point de deux voies de synthèses complémentaires des deux énantiomères du *cis*- 3,4 CB-GABA. Chaque voie inclue une étape-clé de photocycloaddition [2+2] permettant de créer le cyclobutane. La première voie consiste en une homologation du *cis*-ACBC racémique, dont la préparation, déjà décrite dans la littérature, débute par une photocycloaddition [2+2] intermoléculaire entre l'uracile et l'éthylène. Nous montrerons la réduction de l'acide en alcool, la substitution de cet alcool résultant par un nitrile, puis l'hydrolyse basique du nitrile afin de former l'acide attendu. La deuxième voie repose sur une synthèse multi-étapes à partir du caprolactame, qui implique une photocycloaddition [2+2] intramoléculaire

d'une azépin-2-one. L'obtention des énantiomères purs du *cis*-^{3,4}CB-GABA sera effectuée par un dédoublement à l'aide d'une copule chirale.

Dans ce travail, nous utiliserons la synthèse du laboratoire pour obtenir le *cis*-^{2,3}CB-GABA sous forme énantiomériquement pure, et nous présenterons la synthèse d'homo-oligomères de ce γ -aminoacide et l'étude de leur structuration (**Figure 32**).

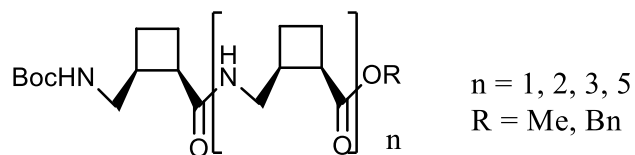


Figure 32 : Oligomères du (+)-**57**.

Résultats et discussion

III- Synthèse du *cis*-^{3,4}CB-GABA (±)-115 énantio pure

A- Synthèse du (±)-Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA (±)-139 par homologation du (±)-Boc-*cis*-ACBC

Une première stratégie envisagée pour accéder au *cis*-^{3,4}CB-GABA (±)-115 était l'homologation de l'acide *cis*-2-aminocyclobutanique (*cis*-ACBC). La synthèse du (±)-Boc-*cis*-ACBC (±)-119 publiée dans la littérature.⁹¹ Cette méthode consiste en une cycloaddition photochimique [2+2] entre le Boc-uracile **117** et l'éthylène, suivie d'une hydrolyse basique du cycloadduit obtenu. L'homologation de l'acide carboxylique du (±)-*cis*-ACBC devrait conduire au (±)-Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA (±)-139 (Schéma 32). Un dédoublement racémique sera envisagé sur celui-ci afin d'obtenir chacun des énantiomères du (±)-Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA (±)-139.

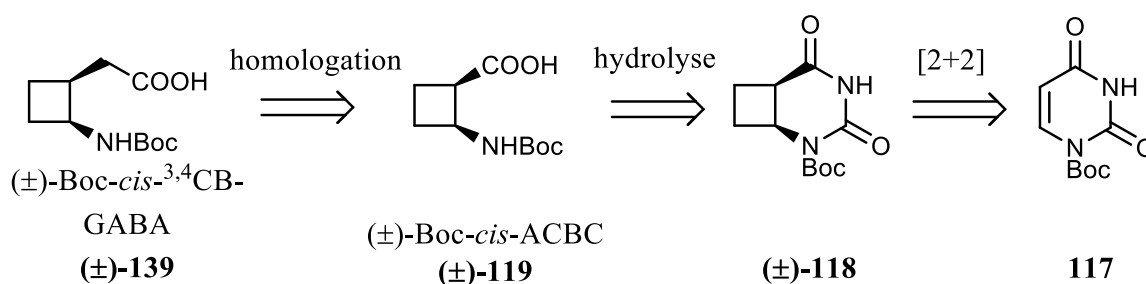


Schéma 32 : Schéma de la rétrosynthèse du *cis*-^{3,4}CB-GABA par homologation du *cis*-ACBC.

a- Synthèse du (±)-Boc-*cis*-ACBC, (±)-119

L'uracile **116** a été d'abord protégé sélectivement par du Boc₂O en présence de DMAP dans l'acétonitrile pour donner le produit **117** avec un rendement brut de 87 % (Schéma 33).

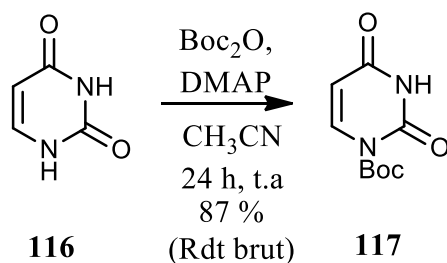


Schéma 33 : Synthèse du Boc-uracile **117**.

Celui-ci a subi une réaction de photocycloaddition [2+2]. Une réaction photochimique nécessite une source de lumière qui émet des longueurs d'onde qui correspondent à une transition électronique d'un chromophore présent dans le milieu réactionnel.

La lampe que nous avons utilisée pour faire la réaction photochimique est une lampe à vapeur de mercure de 400 W qui émet une lumière ayant des longueurs d'onde dans le spectre de l'UV. Pour cela, le choix du filtre est important et dépend de la zone d'absorbance du chromophore de la molécule cible. Un filtre en quartz laisse passer des irradiances ayant des longueurs d'onde supérieures à 200 nm, alors qu'un filtre en pyrex laisse passer les irradiances supérieures à 290 nm (**Tableau 1**).⁹²

Tableau 1 : Les longueurs d'ondes (nm) des irradiances qui donnent 20 %, 50 % et 90 % de transmission à travers un filtre de 1 mm de quelques verres

Verre	Transmission		
	20 %	50 %	90 %
Quartz	< 200	< 200	240
Vycor	200	220	280
Corex	270	290	360
Pyrex	290	300	360

Lors de l'absorption d'un photon, le Boc-uracile (\pm)-**117** passe de l'état fondamental S_0 vers un état excité singulet S_1 . Celui-ci évolue vers un état excité triplet T_1 par passage inter-système (PIS) où les électrons ont le même spin (**Figure 33** L'état excité triplet possède une durée de vie supérieure à celle de l'état singulet, ce qui lui permet d'effectuer une réaction photochimique.

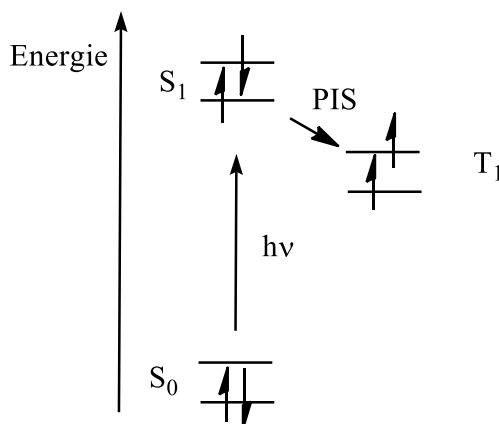
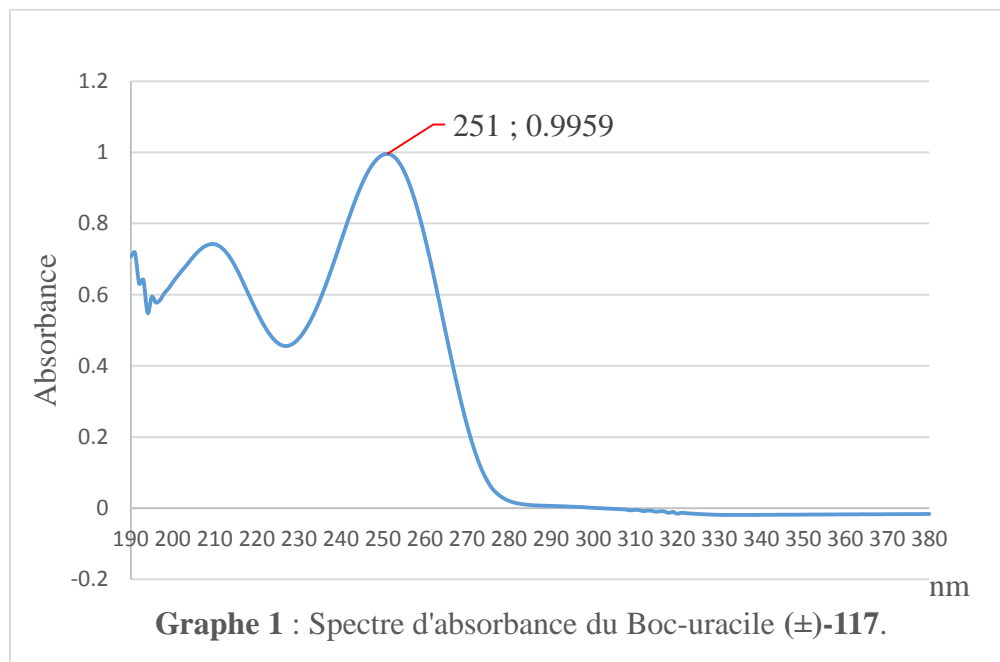
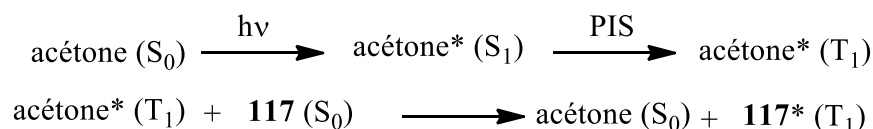


Figure 33 : Diagramme énergétique montrant les états excités singulet et triplet

Sur la courbe d'absorbance du Boc-uracile (\pm)-**117** (0.062 mM dans CHCl_3), on peut voir un maximum d'absorption à 251 nm, avec une faible épaule à 295 nm (**Graphe 1**).



Or, un filtre en pyrex ne laisse passer que les irradiances supérieures à 290 nm, alors qu'un filtre en quartz laisse passer les irradiances supérieures à 200 nm, ce qui pourrait exciter des liaisons non désirables et former des produits secondaires. Pour résoudre cela, un photosensibilisateur a été utilisé. Un photosensibilisateur subit l'excitation photochimique (sens^*) et transfère son excès d'énergie à une autre molécule (**117**) dans le même environnement :



L'acétone a été utilisée comme solvant et photosensibilisateur (sens) en même temps afin de transférer l'excitation de son état $n\pi^*$ vers l'état $\pi\pi^*$ de la double liaison conjuguée du composé **117**.

Pour que le transfert électronique soit permis, l'énergie de l'état excité de la molécule (Boc-uracile **117**) doit être inférieure ou égale à celle du photosensibilisateur (acétone) à l'état triplet ($\lambda_{\text{max}} n\pi^*$ ($\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$) : 336 nm > $\lambda_{\text{max}} n\pi^*$ ($\text{C}=\text{O}$) : 279 nm). En plus, il doit y avoir une conservation du spin global.

Sans purification, le produit brut **117** a été mis en solution (25 mM) dans l'acétone dans un réacteur de 1 L muni d'un filtre en pyrex (**Figure 34**), puis irradié par une lampe à vapeur de mercure pendant 4 h sous barbotage d'éthylène.

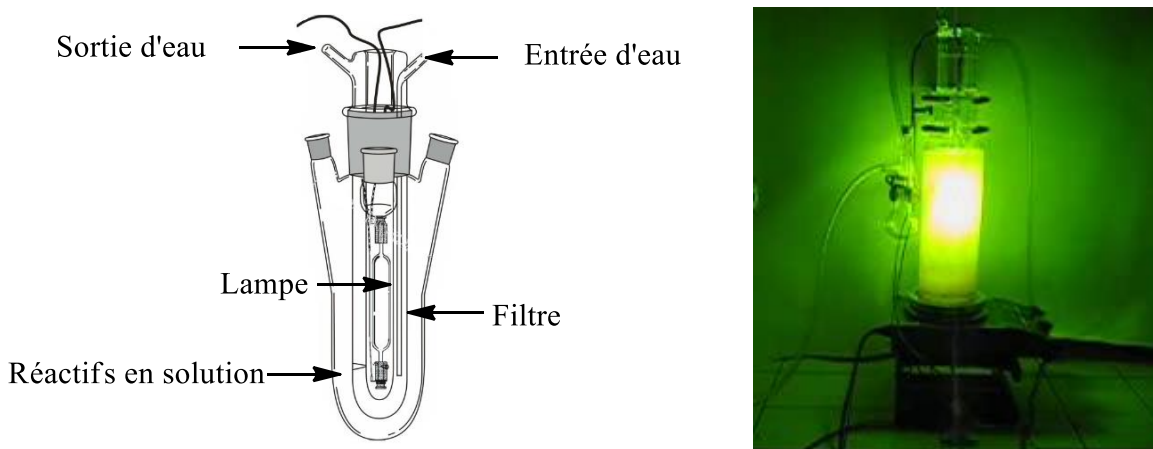


Figure 34 : Schéma d'un réacteur photochimique (gauche) ; photo d'un réacteur photochimique en pyrex (ou quartz) avec une lampe UV allumée (droite).

L'éthylène vient réagir sur le Boc-uracile (\pm)-**117** pour donner les deux énantiomères (\pm)-**118** (**Schéma 34**).

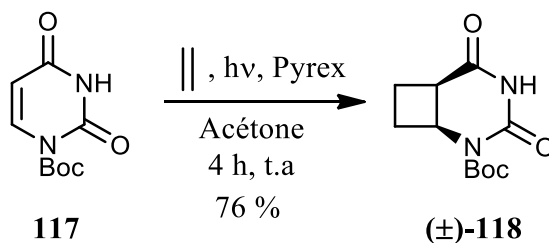


Schéma 34 : Photocycloaddition du Boc-uracile **117**.

Le cycloadduit formé (\pm)-**118** est composé par la jonction de deux cycles : cycle à quatre et cycle à six. Une telle jonction préfère la formation des cycloadduits *cis* pour des raisons de tension de cycle.

Nous avons ainsi obtenu le mélange racémique du cycloadduit (\pm)-**118** avec un rendement sur deux étapes de 66 % après purification par chromatographie.

L'ouverture du bicycle (\pm)-**118** a été réalisée par action de la soude 0,5 M à température ambiante puis de la soude solide (25 eq) à 0 °C, pour former l'acide aminé *N*-Boc désiré (\pm)-**119** avec un rendement de 74 % après purification (**Schéma 35**).

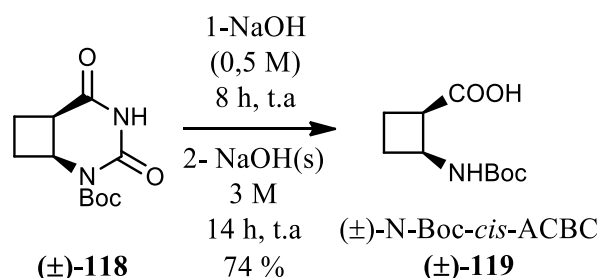


Schéma 35 : Synthèse du (±)-Boc-*cis*-ACBC.

b- Homologation du (±)-Boc-*cis*-ACBC, (±)-119

1- Synthèse d'Arndt-Eistert

Dans un premier temps nous avons voulu utiliser la synthèse d'Arndt-Eistert afin d'avoir accès au γ -aminoacide cyclobutanique **139**. Cette réaction a été souvent appliquée pour passer d'un α -aminoacide à un β -aminoacide^{93,94} mais plus rarement pour passer d'un β - à un γ -aminoacide.^{76,95,96,97}

La synthèse d'Arndt-Eistert consiste à la conversion d'un acide carboxylique activé en diazocétone par l'intermédiaire d'un diazométhane (±)-**120**, suivie par un réarrangement de Wolff en présence d'un nucléophile (**Schéma 36**). Le diazométhane étant toxique et explosive, le triméthylsilyldiazométhane (TMSCHN₂) a été utilisé comme alternative.^{98,99}

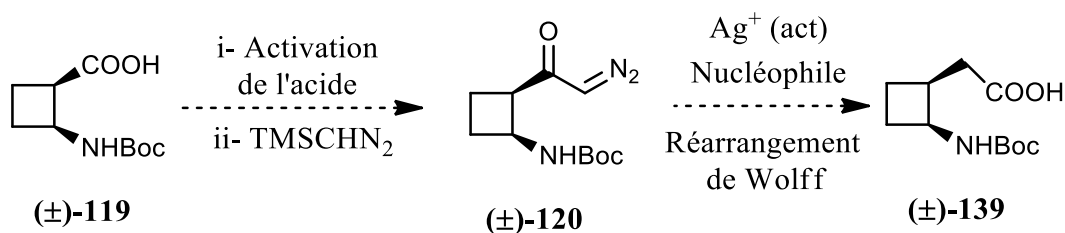


Schéma 36 : Homologation du Boc-*cis*-ACBC **119** en γ -aminoacide *N*-Boc **133**.

Le produit (±)-**119** a été mis en réaction avec le chloroformate d'éthyle (1 eq) en présence de Et₃N anhydre (1 eq) dans le THF à -15 °C. La réaction a été agitée pendant 3 h à -5 °C. L'anhydride mixte formé a ensuite été mis en présence de 2 eq de TMSCHN₂ dans l'acétonitrile à 0 °C et agité pendant 24 h à 0 °C (**Schéma 37**). Le diazocétone (±)-**120** attendue n'a pas été formée et une grande partie du composé de départ a été retrouvée inchangé. L'analyse du spectre RMN montre aussi la formation de l'ester méthylique (±)-**122**. Cela est dû à la formation de l'ester triméthylsilylméthylique (±)-**121** qui après lavage acide conduirait à l'ester (±)-**122**.⁹⁸

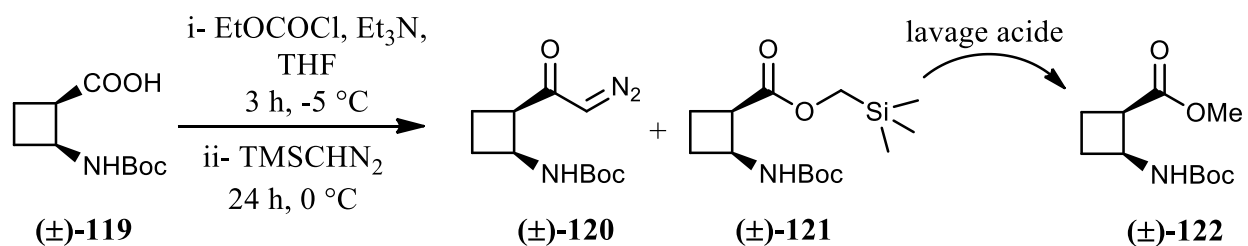


Schéma 37 : Tentative de formation de la diazocétone à partir du Boc-*cis*-ACBC (±)-119.

Nous avons effectué cette même réaction sur la Boc-Phe-OH, exemple déjà décrit dans la littérature,⁹⁸ mais nous n'avons observé aucune trace de produit voulu. L'ester méthylique a de nouveau pu être observé sur les spectres RMN ¹H.

L'utilisation de l'EDCI pour activer la Boc-Phe-OH n'a pas non plus conduit à la diazocétone escomptée, mais à un mélange de composé non identifiées.

Nous avons alors abandonné cette réaction et passé à une autre voie d'homologation.

2- Méthodologie de cyanocétophosphorane

Wasserman et coll.¹⁰⁰ ont décrit la synthèse d' α -cétoesters à partir d'acide carboxylique par réaction avec un cyanocétophosphorane (**Schéma 38**).

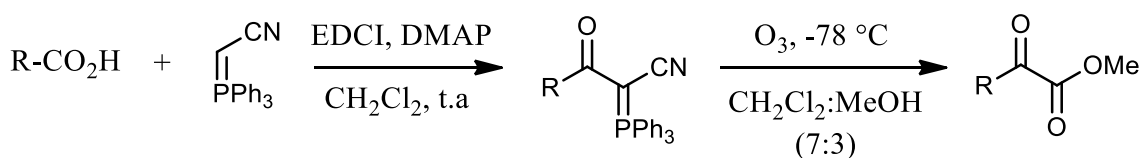


Schéma 38 : Synthèse d' α -cétoester à partir d'un acide carboxylique.

Aitken et coll.^{101,102} ont aussi utilisé cette synthèse pour obtenir des α -cétoesters (±)-*cis*-2-oxalylcyclobutane carboxylique diméthylester **127** et (±)-*cis*-2-oxalylcyclobutanecarboxylic dibenzylester **128** à partir de l'acide (±)-*cis*-2-méthoxycarbonylcyclobutanique **123** et l'acide (±)-*cis*-2-benzyloxycarbonylcyclobutanique **124** respectivement en passant par des α -cétocyanophosphorane **125** et **126** (**Schéma 39**).

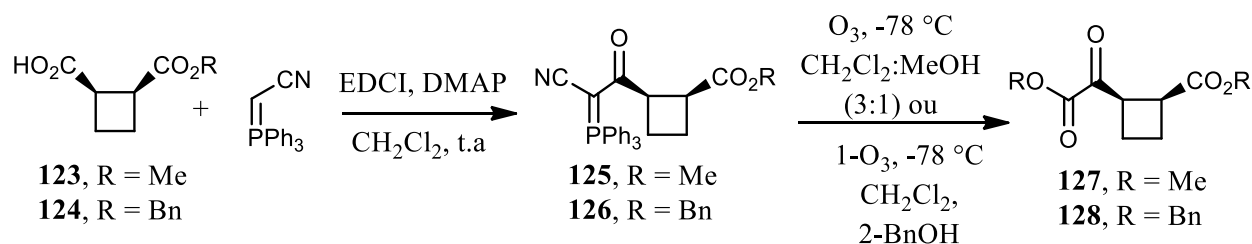


Schéma 39 : Synthèse d' α -cétoesters à partir d'acides carboxyliques cyclobutaniques.

Nous avons testé cette méthodologie sur le Boc-*cis*-ACBC (\pm)-**119**. Tout d'abord l'acide (\pm)-**119** a été mis en réaction avec la cyanométhylène triphénylphosphorane commerciale en présence d'une carbodiimide (EDCI.HCl) et de DMAP pour donner l' α -cétocyanophosphorane (\pm)-**129** avec un rendement de 73 % après purification (**Schéma 40**).

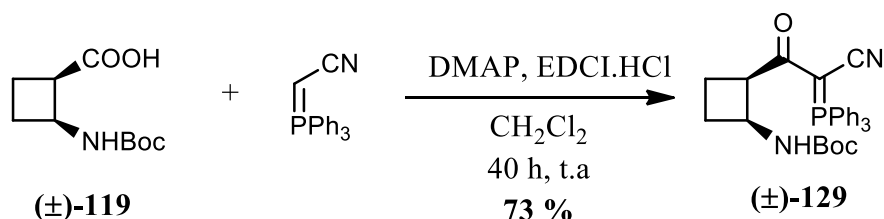


Schéma 40 : Formation de l' α -cétocyanophosphorane.

Le composé (\pm)-**129** a ensuite subi une ozonolyse en milieu réducteur (Me_2S) pour donner l' α -cétoester (\pm)-**130**. Trois heures après l'ajout de Me_2S , en CCM, nous avons pu constater la disparition totale du composé de départ (**Schéma 41**).

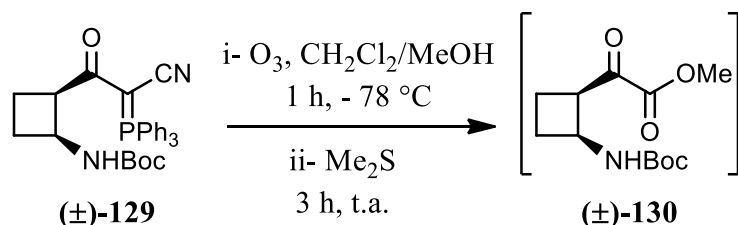


Schéma 41 : Ozonolyse de l' α -cétocyanophosphorane.

Cependant, le cétoester (\pm)-**130** semblait être instable, et s'est dégradé seul à température ambiante en une nuit. Seul un spectre de masse nous a permis de mettre en évidence la présence de ce produit. Nous avons tenté de le purifier par chromatographie, mais nous n'avons retrouvé que des produits de dégradation. Nous avons essayé de refaire cette synthèse en engageant directement l' α -cétoester (\pm)-**130** dans l'étape suivante de réduction dans les conditions de Miyagawa et coll.¹⁰³ Après concentration du milieu réactionnel, le produit (\pm)-**130** brut a été mis en réaction avec du

Palladium sur charbon en présence de l'hypophosphite de sodium dans un mélange dioxane/eau (1:1). Mais le suivi de cette réaction par CCM n'a montré que la formation de nombreux produits de dégradation (**Schéma 42**).

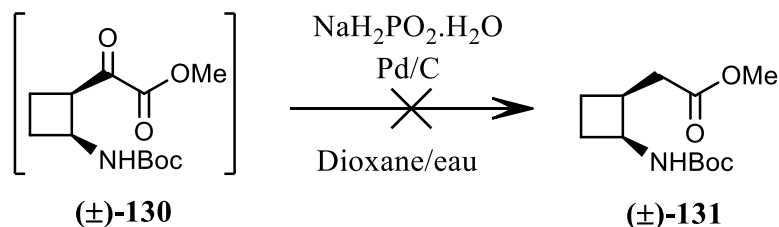


Schéma 42 : Réduction de l' α -cétoester.

3- Homologation par réduction/substitution

Cette nouvelle stratégie envisagée pour réaliser l'homologation était inspirée des travaux de Kennewell et coll.⁴⁶ et de Krogsgaard-Larsen et coll.,¹⁰⁴ sur les synthèses d'acides *cis* et *trans* 2-amino-cycloalkyliques (**Schéma 43**). Tout d'abord, l'acide *N*-Boc (±)-119 devra subir une réduction en alcool (±)-133. L'alcool obtenu sera substitué par un nitrile (±)-138. L'hydrolyse basique du nitrile (±)-138 générera l'acide homologué (±)-139.

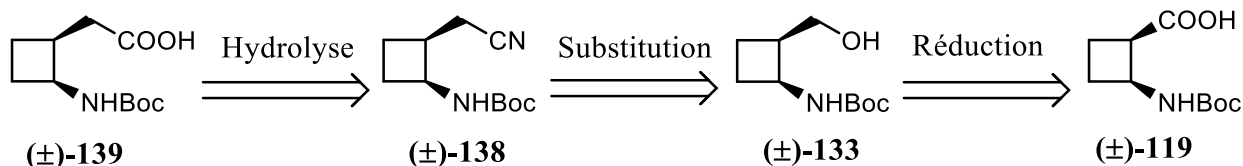


Schéma 43 : Schéma rétrosynthétique de l'homologation du Boc-*cis*-ACBC (±)-119.

L'acide *N*-Boc (±)-119 a été réduit directement¹⁰⁵ avec le $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (5 eq) dans du THF anhydre pendant 7 h à 0 °C, pour donner l'alcool (±)-133 avec un rendement de 43 %. Le rendement n'étant pas satisfaisant, nous avons alors essayé de transformer l'acide *N*-Boc (±)-119 en ester méthylique (±)-131 dans le MeOH, en présence de DCC (1,1 eq) et de DMAP (0.1 eq), selon une méthode décrite dans la littérature,¹⁰⁶ ce qui a fourni l'ester (±)-131 avec un rendement de 83 %. Une réduction sélective¹⁰⁷ de l'ester (±)-131 a été ensuite effectuée avec le borohydrure de sodium (10 eq) au reflux de l'EtOH pendant 1 h, et a conduit à l'alcool (±)-133 avec 97 % de rendement (**Schéma 44**). De ce fait, le rendement global de la réduction en deux étapes (81 %) reste supérieur à celui de la réduction directe (43 %), et semble être plus efficace.

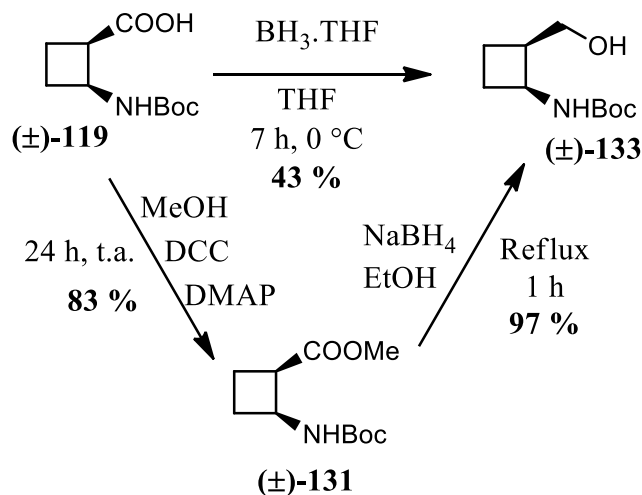


Schéma 44 : Réduction du Boc-*cis*-ACBC (±)-118.

Plusieurs approches ont été examinées pour transformer l'alcool (±)-133 en un bon groupe partant afin d'introduire le groupement nitrile pour avoir un carbone supplémentaire nécessaire à l'homologation (**Schéma 45**).

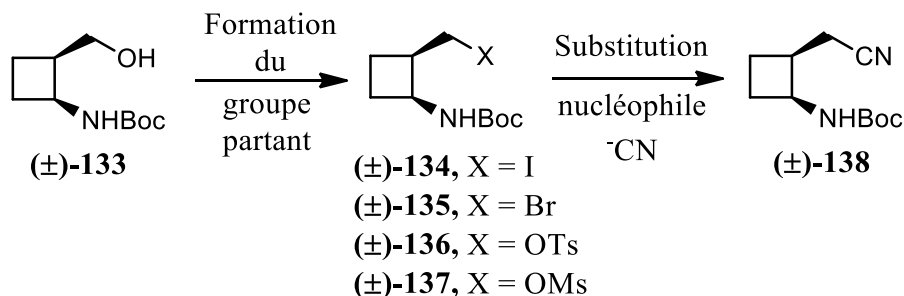


Schéma 45 : Approches utilisées pour la transformation de l'alcool (±)-133 en nitrile (±)-138.

Essai 1 :

Dans un premier temps, nous avons essayé d'obtenir le produit iodé (±)-134.¹⁰⁸ L'alcool (±)-133 a été ajouté à une solution contenant de l'iode (1.3 eq), de l'imidazole (2.5 eq), et du PPh₃ (1,3 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre, sous atmosphère d'argon et ce mélange a été chauffé au reflux pendant une nuit. La purification du brut réactionnel sur colonne de silice a permis d'isoler l'oxazinone (±)-140 avec 39 % de rendement (**Schéma 46**).

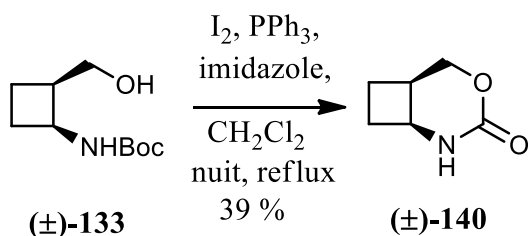


Schéma 46: Formation de l'oxazinone (±)-140.

La formation de l'oxazinone (±)-140 est déjà connu dans la littérature. En effet, la propension du groupement Boc à réagir avec des électrophiles en intramoléculaire a été montrée par Agami et Couty.¹⁰⁹ Au cours de ce mécanisme, c'est l'oxygène du carbonyle qui attaquerait l'électrophile simultanément avec la coupure de la liaison C–O du radical *t*-butyloxy. Le carbocation *t*-butyle ainsi libéré conduirait ensuite à l'isobutène par réaction d'élimination (**Schéma 47**).

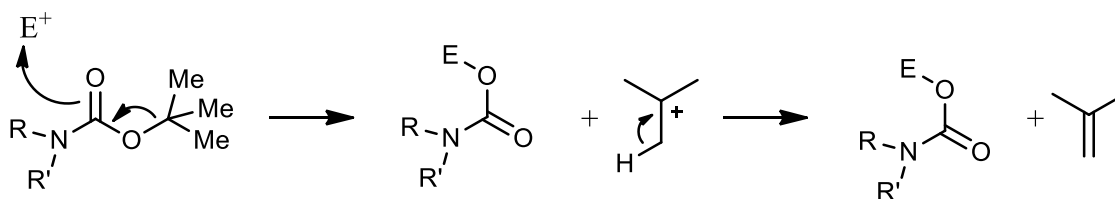


Schéma 47 : Réactivité du Boc envers un électrophile.

Essai 2 :

Afin de minimiser le phénomène de cyclisation, nous avons pensé à faire une bromation à la place d'une iodation, puisqu'une liaison C-Br est moins réactive que C-I (du fait de la haute polarisabilité de l'atome Iode). Nous avons tenté la préparation du nitrile (±)-138 en passant par le bromure intermédiaire (±)-135 selon un procédé one pot¹¹⁰. La triphénylphosphine (3eq) et le tetrabromométhane (3 eq) ont été ajoutés à une solution d'alcool (±)-133 dans le diméthylformamide, et le mélange a été agité à température ambiante pendant 2 h. Le suivi de la réaction par CCM montre la disparition totale de l'alcool de départ. 10 eq de KCN ont alors été ajoutés au mélange réactionnel qui a été laissé 4 h sous agitation. Une purification par chromatographie a été réalisée, et l'analyse du spectre RMN d'une fraction obtenue montre la formation du produit cyclisé (±)-140 en mélange avec l'oxyde de triphénylphosphine, avec un rendement de 39 %. De plus, les analyses des spectres IR et de masse sur une autre fraction ont montré la présence d'un mélange de produit bromé (±)-135 et du nitrile (±)-138 inséparables sur colonne de silice.

Smith et coll.¹¹¹ ont observé ce type de cyclisation en traitant l'aminoalcool **141** par PPh₃/CBr₄. Ils ont obtenu l'oxazinone bicyclique **143** accompagnées de traces du produit bromé **142** (Schéma 48).

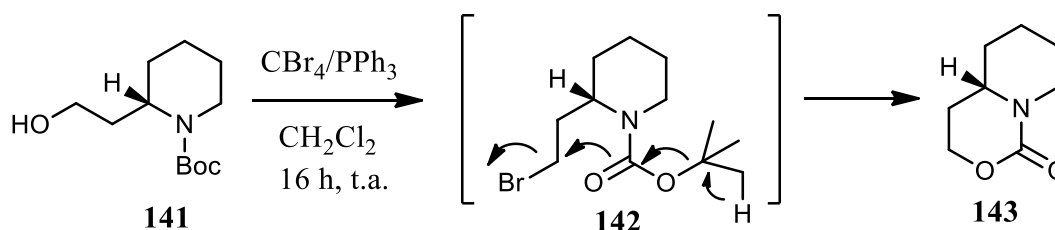


Schéma 48 : Cyclisation de l'aminoalcool **140** en oxazinone **143**.

Essai 3 :

Aitken et coll.¹¹² ont utilisé le TMSI pour effectuer la substitution d'un alcool par un iode sur un aminoacide cyclopropanique (Schéma 49).

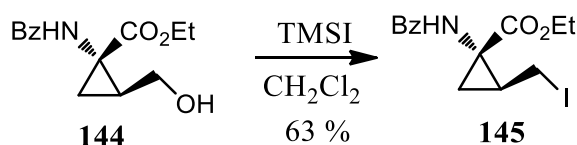


Schéma 49 : Iodation de l'alcool **143**.

Nous avons testé ces mêmes conditions sur l'alcool (±)-**133**. A cette fin, l'iodure de triméthylsilyl (6 eq) a été ajouté à une solution d'alcool (±)-**133** dans le chloroforme sous Argon à 0 °C. Le mélange réactionnel a ensuite été agité pendant 4 h à température ambiante.¹¹³ Le suivi de la réaction par CCM a montré la formation d'un seul produit très polaire. Après traitement de la réaction, le produit majoritaire a pu être retrouvé dans la phase aqueuse. L'analyse de son spectre RMN proton a montré qu'il s'agissait de l'aminoalcool déprotégé (±)-**146** (Schéma 50).

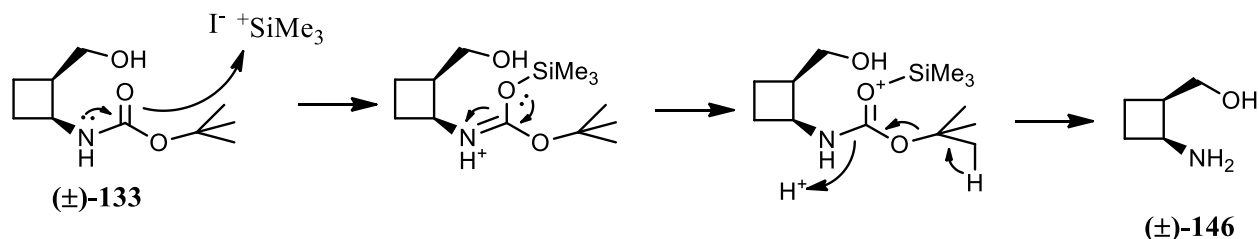


Schéma 50 : Formation de l'aminoacide déprotégé (±)-**145**.

Essai 4 :

La tosylation de l'alcool (\pm)-**132** a été effectuée en traitant ce dernier avec le chlorure de tosyloxy, en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane, à température ambiante, pendant 4 h.¹¹⁴ Le produit obtenu a été directement impliqué dans la réaction suivante.¹⁰⁸ Il a donc été traité par KCN (1,5 eq), dans du DMSO anhydre. La réaction est agitée à 80 °C sous argon pendant 24 h. Le suivi par plaques CCM a montré de nombreux produits de dégradation. Une purification sur colonne de silice du mélange obtenu ne nous a permis d'isoler aucun produit exploitable. Nous avons repris la première étape de tosylation dans les mêmes conditions, puis nous avons effectué la substitution nucléophile par KCN dans du DMSO anhydre, en présence d'un éther couronne (18-crown-6 ; 1,5 eq) sous agitation pendant 8 h à 80 °C.¹¹⁵ Une dégradation du produit final a encore été observée.

Essai 5 :

Nous avons tenté la mésylation de l'alcool (\pm)-**133** dans des conditions classiques.¹¹⁶ Le composé mésylé (\pm)-**137** a été obtenu par réaction de l'alcool (\pm)-**133** avec le chlorure de mésyle en présence de Et₃N distillée (1,5 eq), dans l'Et₂O, sous atmosphère d'Argon pendant 40 min (**Schéma 51**). La purification du brut réactionnel par colonne de silice nous a permis d'obtenir le produit mésylé (\pm)-**137** avec un rendement de 97 %.

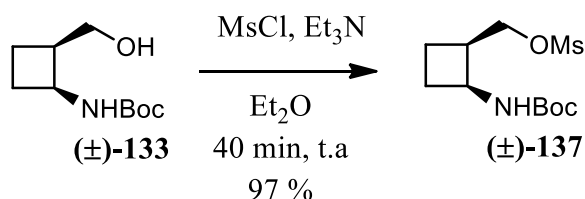


Schéma 51 : Mésylation de l'aminoolcool (\pm)-**133**.

Nous avons alors tenté la transformation du mésylate (\pm)-**137** en nitrile (\pm)-**138**. Pour cela, nous avons ajouté 5 eq de NaCN pulvérisé et sec (séchage sous vide à 120 °C durant 20 h),¹¹⁷ sur une solution de mésylate (\pm)-**137** dans le DMSO anhydre sous atmosphère d'Argon. L'ajout de NaCN a provoqué une élévation de la température du milieu réactionnel. Le mélange a été ensuite agité à 90 °C.¹¹⁸ Après 3 h, le suivi en CCM a montré la disparition totale du composé de départ (**Schéma 52**). La chromatographie sur colonne de silice du brut réactionnel a fourni 11 % de nitrile (\pm)-**138**, 27 % de l'oxazinone (\pm)-**140** et des produits de dégradation.

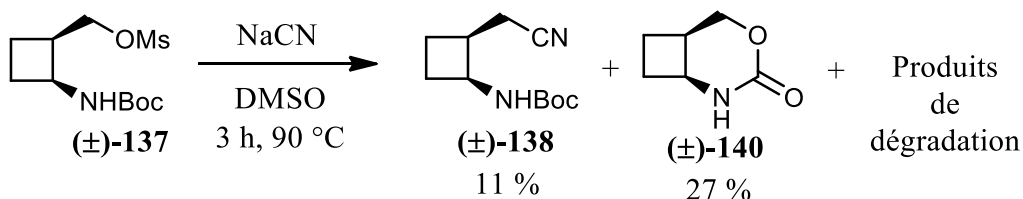


Schéma 52 : Réaction de formation du nitrile.

La réaction de transformation du mésylate (±)-137 en nitrile (±)-138 a été répétée avec 5 eq de NaCN pulvérisé, dans le DMSO, et en agitant le mélange réactionnel à température ambiante. Après 3 jours, le composé de départ étant encore visible en CCM, nous avons ajouté 5 eq de NaCN. Après 3 jours de plus, les plaques CCM n'ont montré aucun changement. La purification du brut réactionnel a donné 69 % de nitrile (±)-138, 11 % d'oxazinone (±)-140 et nous avons récupéré 20 % du composé de départ.

Afin d'éviter la dégradation et la cyclisation probablement dues à une température trop élevée, nous avons pensé à fixer la température à 35 °C. Pour cela, le NaCN pulvérisé (5 eq) a été ajouté sur la solution de mésylate (±)-137 dans le DMSO anhydre à 0 °C (**Schéma 53**). Après 24 h, le composé de départ étant encore visible en CCM, nous avons ajouté 5 eq de NaCN. Après 48 h de plus, les plaques CCM ont montré la conversion totale du mésylate (±)-137 de départ. Le brut réactionnel a été purifié sur colonne de silice. Nous avons pu isoler 92 % de nitrile (±)-138 et 7 % de l'oxazinone (±)-140.

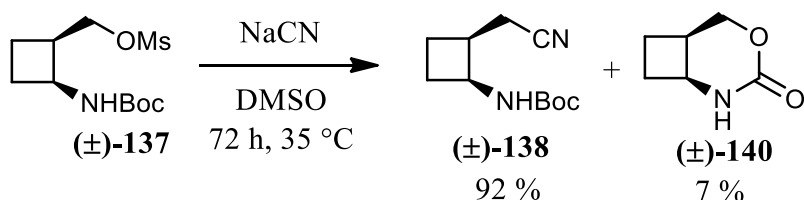


Schéma 53 : Réaction de formation du nitrile à plus basse température.

Nous avons ensuite effectué l'hydrolyse de la fonction nitrile selon des conditions décrites dans la littérature.¹¹⁹ Sur une solution de nitrile (±)-138 dans l'éthanol, a été ajoutée une solution aqueuse de soude (6 M, 33 eq). Le mélange réactionnel a été agité pendant 3 h 30 au reflux du solvant (**Schéma 54**). Le brut réactionnel a été purifié sur colonne de silice. Nous avons pu isoler 73 % de l'acide aminé *N*-Boc homologué (±)-138.

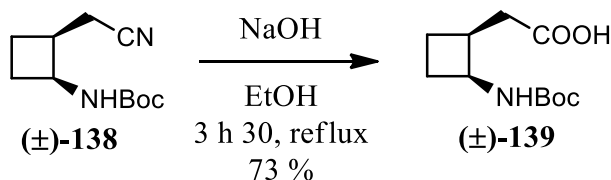


Schéma 54 : Hydrolyse basique et formation de l'acide *N*-Boc homologué.

Le groupement protecteur Boc n'étant pas inerte lors de la réaction de substitution, nous avons pensé à son remplacement par un autre groupement protecteur sur l'alcool (±)-133. Pour cela, l'alcool (±)-133 a été traité par du TFA (33 eq) dans le dichlorométhane pendant 25 min à 0 °C pour conduire au produit (±)-147 (**Schéma 55**).

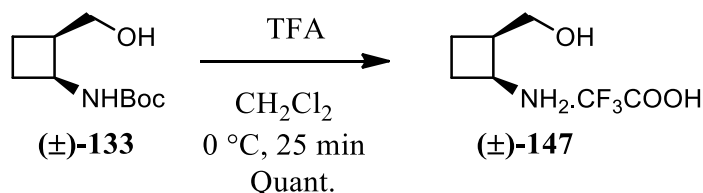


Schéma 55 : Déprotection de l'alcool (±)-133.

Un essai de protection a été effectué :

Nous avons tenté la dibenzylation de l'aminolcool (±)-147 dans des conditions décrites par Porzi et coll.,¹²⁰ en faisant réagir celui-ci avec du bromure de benzyle (2.1 eq) dans l'acétone (2 mL) en présence de K₂CO₃ (4 eq) à température ambiante. Le suivi de la réaction par CCM a montré que le composé de départ était toujours présent après 40 h, et qu'il y avait formation d'un nouveau produit. Nous avons alors ajouté du DMF (2 mL) afin d'augmenter la solubilité de K₂CO₃ dans le milieu réactionnel. Le composé de départ n'étant toujours pas totalement converti après 20 h à température ambiante, le mélange réactionnel a été porté à reflux pendant 6 h, sans aucun changement observable en CCM. Une purification par chromatographie du brut nous a permis d'isoler le produit monobenzylé (±)-148 avec 35 % de rendement, ainsi que des produits non identifiables (**Schéma 56**).

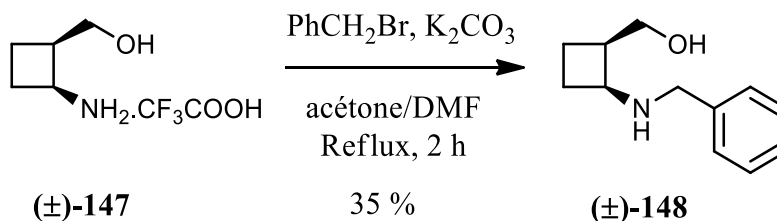


Schéma 56 : Protection de l'aminolcool par le bromure de benzyle.

Nous avons tenté d'introduire un deuxième groupement benzyle en utilisant les conditions opératoires de Porzi et coll.¹²⁰ Le composé monobenzylé (±)-**148** a été mis en présence d'iodure de tetrabutylammonium (0.3 eq), de K₂CO₃ (2 eq) et de bromure de benzyle (1 eq) dans le CH₃CN. La réaction a été agitée pendant 17 h à reflux sous atmosphère d'Argon. Le composé dibenzylé (±)-**149** avec un rendement de 39% (**Schéma 57**).

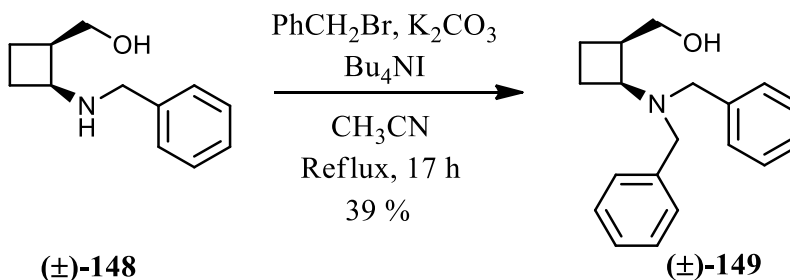


Schéma 57 : Benzyltion de l'aminoalcool (±)-**148** en présence d'un agent de transfert de phase.

Au vu des résultats peu concluants de ces tentatives de dibenzyltion et du rendement global faible (14 %), nous n'avons pas poursuivi nos investigations dans cette voie.

En conclusion, nous avons pu synthétiser le (±)-Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA ((±)-**139**) par homologation du (±)-Boc-*cis*-ACBC ((±)-**119**). Le rendement global de cette synthèse a été de 26 % sur 8 étapes à partir de l'uracile commercial.

Les énantiomères du Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA (**139**) pourraient être obtenus suivant cette même voie de synthèse à partir du Boc-*cis*-ACBC (**119**) disponible sous forme énantio pure.

B- Deuxième stratégie de synthèse en série racémique : à partir du caprolactame

a- Présentation de la stratégie

Nous avons envisagé une autre voie de synthèse du (±)-Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA à partir du caprolactame commercial **150** commercial. La formation du cycle à quatre chaînons devrait être effectuée par une photocycloaddition [2+2] intramoléculaire. La synthèse du bicyclic (±)-**154** à partir du caprolactame commercial **150** a déjà été publiée dans la littérature.^{121,122} Le bicyclic (±)-**154** pourrait ensuite être transformé en (±)-Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA ((±)-**139**) après protection de la fonction amine et ouverture par hydrolyse du lactame (**Schéma 58**).

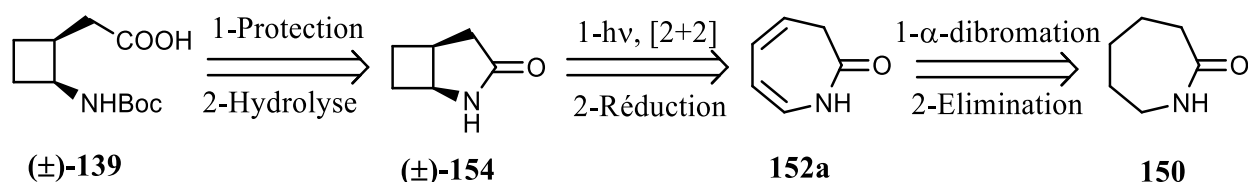


Schéma 58 : Stratégie de synthèse du (\pm) -Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA à partir du caprolactame.

b- Synthèse du (\pm) -Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA, (\pm) -139

A partir du caprolactame commercial **150**, deux étapes ont été effectuées pour accéder au caprolactame **152a** (**Schéma 59**). La bromation du caprolactame **150** a été effectuée en présence de pentachlorure de phosphore, de chlorure de Zinc et de dibrome.¹²¹ Après purification sur colonne de silice, le caprolactame dibromé **151** a été isolé avec 73 % de rendement.

La deuxième étape consiste en une double élimination des bromes sur le caprolactame **150** afin de conduire au caprolactame **152a**.¹²² Cette réaction a été réalisée par réaction avec du chlorure de Lithium sec dans le DMF anhydre. Le caprolactame **151a** a été obtenu avec 59 % de rendement après purification sur colonne de silice.

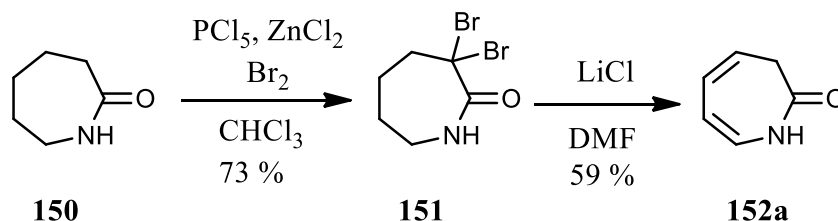


Schéma 59 : Synthèse du caprolactame conjugué **151a**.

L'obtention du composé déconjugué **152a** plutôt que du composé **152b** peut s'expliquer par une tension de cycle trop forte du cycle **152b** dans l'enchaînement des 5 carbones (C₂→C₆) hybridés sp² de l'oxygène et de l'azote (**Schéma 60**).

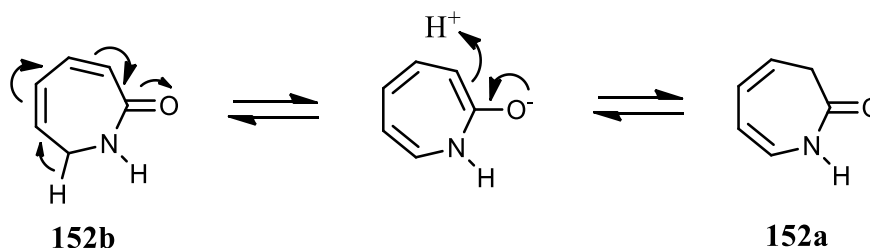
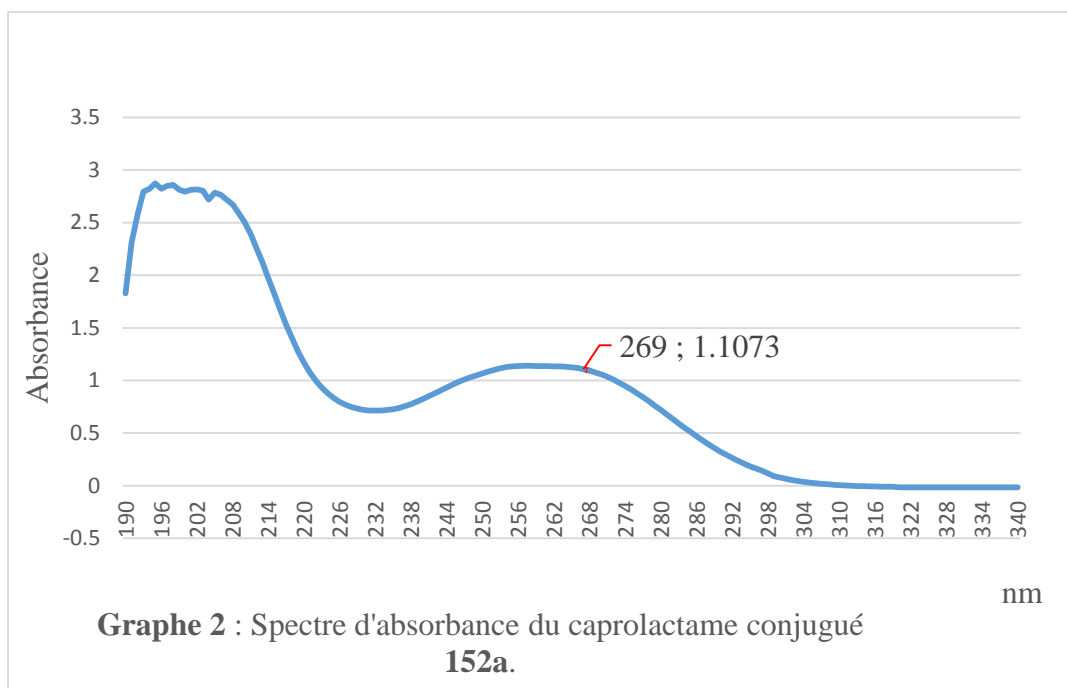


Schéma 60 : Formation du caprolactame le plus stable.

Ensuite, le caprolactame **152a** a subi une réaction de photocycloaddition [2+2] intramoléculaire, suivant le protocole expérimental décrit dans la littérature (**Schéma 61**).¹²³ Une solution du caprolactame **152a** dans de l'Et₂O anhydre, a été irradiée pendant 3 h par une lampe à mercure de 400 W, dans un réacteur muni d'un filtre en quartz, et refroidi par un bain externe eau-glace. L'utilisation du filtre en quartz a été déterminée d'après l'analyse du spectre d'absorbance du caprolactame **152a** réalisé dans l'acétonitrile à 0.11 mM (**Graph 2**). On peut voir sur ce graphe que le composé **152a** possède un maximum d'absorbance à 269 nm. Nous n'avons donc pas eu besoin d'utiliser un photosensibilisateur puisque le caprolactame **152a** peut être directement excité.



Le bicyclic (\pm)-**153** a ainsi été formé avec un rendement brut quantitatif. Ce cyclo-adduit (\pm)-**153** a ensuite été réduit par hydrogénation catalytique (H₂ en présence de Palladium sur charbon) pour donner le produit (\pm)-**154** avec un rendement brut de 95 %.

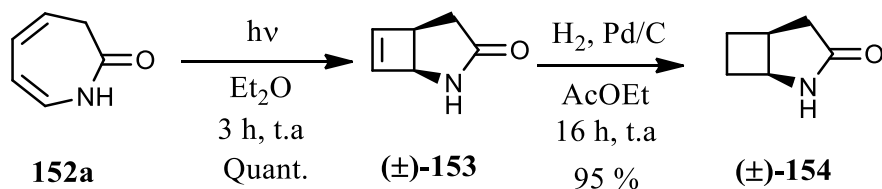


Schéma 61 : Cyclisation du caprolactame **152a** et réduction du composé (\pm)-**153**.

Ensuite, l'azote du bicyclic (\pm)-**154** a été protégé par le groupement Boc pour conduire au produit (\pm)-**155** avec 100 % de rendement après purification sur colonne de silice. Une hydrolyse basique

en présence de LiOH dans un mélange THF/H₂O a ensuite fourni l'acide aminé *N*-Boc désiré (±)-**139** avec 90 % de rendement après purification sur colonne de silice (**Schéma 62**).

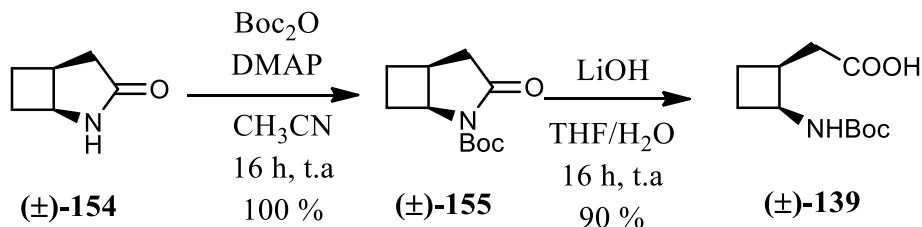


Schéma 62 : Protection du composé (±)-**154** suivie d'une hydrolyse du produit (±)-**155** pour donner le γ -aminoacide *N*-Boc souhaité (±)-**139**.

En conclusion, nous avons pu synthétiser le (±)-Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA ((±)-**139**) à partir du caprolactame commercial en 6 étapes avec un rendement global de 37 %.

c- Comparaison des deux stratégies

La première voie d'accès au (±)-Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA (±)-**138** par homologation du (±)-Boc-*cis*-ACBC comporte 8 étapes à partir de l'uracile commercial, avec un rendement global de **26 %**.

La deuxième stratégie de synthèse du (±)-Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA (±)-**138** partant du caprolactame commercial, ne comporte que 6 étapes, pour un rendement global de **37 %**. Cependant cette stratégie ne permet l'obtention que de la forme *cis* du ^{3,4}CB-GABA.

C- Dédoublément du (±)-Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA (±)-**139**

Afin d'accéder aux deux énantiomères du *cis*-^{3,4}CB-GABA (±)-**115** optiquement purs à partir du racémique (±)-**139**, un dédoublément du mélange racémique s'est fait en présence d'un auxiliaire chirale, suivi d'une déprotection de la fonction amine.

Pour un dédoublément efficace, plusieurs facteurs sont à prendre en compte. La formation des diastéréoisomères doit s'effectuer avec un bon rendement. La séparation des diastéréoisomères doit être aisée et la coupure de la copule chirale doit permettre de retrouver chacun des énantiomères sans trop de perte de produit.

Nous avons testé plusieurs auxiliaires chiraux. Nous avons préparé des esters du (±)-*cis*-Boc-^{3,4}CB-GABA (±)-**139** à partir du (–)-phényléthanol (–)-**156**, du (*L*)-(–)-menthol (–)-**157**, de la (–)-*N*-méthyléphédrine (–)-**158**, et du (–)-10-dicyclohexylsulfamoyl-*D*-isobornéol (–)-**159**.^{124,125,126}

D'autre part, nous avons aussi testé la (-)-4-méthyl-5-phényl-2-oxazolidinone (-)-**160** (Figure 35).⁹¹

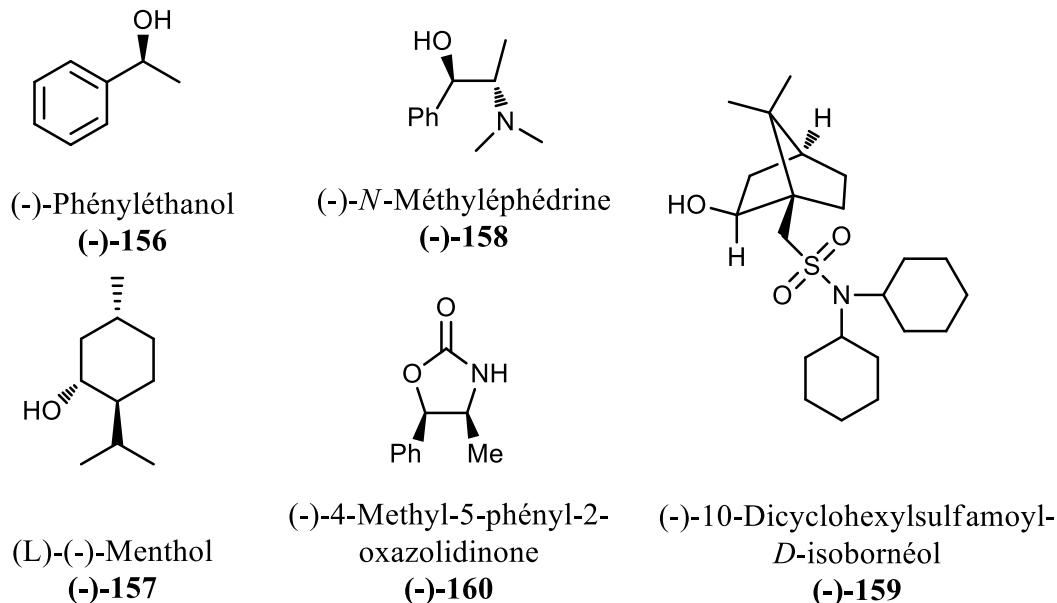


Figure 35 : Les copules chirales utilisées pour le dédoublement du (±)-*cis*-Boc^{3,4}CB-GABA-(±)-**139**.

a- Couplage avec les alcools chiraux

Les tentatives de dédoublements de l'aminoacide (±)-**139** avec les différents alcools chiraux ((-)-**156-159**) ont été effectuées selon une méthode classique (DCC/DMAP) dans le dichlorométhane, à température ambiante pendant 16 h.

Lorsque nous avons couplé l'aminoacide (±)-**139** avec les alcools (-)-**156** et (-)-**158**, les esters **161a/161b** et **163a/163b** ont été obtenus avec des rendements de 65 % et 51 % respectivement (Entrées 1 et 3). Les diastéréoisomères ainsi formés se sont avérés inséparables par chromatographie ou par recristallisation. Dans le cas du couplage avec le (-)-menthol (-)-**157**, les diastéréoisomères obtenus (**162a/162b**) n'ont pas pu être séparés par chromatographie, et seulement partiellement séparables par cristallisation dans du cyclohexane à chaud (Entrée 2). La réaction de l'aminoacide (±)-**139** avec l'alcool (-)-**159** n'a pas conduit aux esters espérés (**164a/164b**) même après 96 h de réaction (Entrée 4). Le composé de départ (±)-**139** a été retrouvé inchangé (Tableau 2).

Tableau 2 : Les estérifications effectuées sur l'acide (±)-**139**.

Entrée	R*-OH	Temps (h)	Rendement (%)	Produits
1	(-)-156	16	65	2 dia inséparables 161a/161b
2	(-)-157	16	75	2 dia partiellement séparables 162a/162b
3	(-)-158	16	51	2 dia inséparables 163a/163b
4	(-)-159	96	0	Pas de réaction

b- Couplage avec la (-)-4-méthyl-5-phényl-2-oxazolidinone

Inspiré par les conditions de dédoublement du (±)-Boc-*cis*-ACBC ((±)-**139**) utilisées dans notre laboratoire,⁹¹ nous avons voulu tester le dérivé d'oxazolidinone (-)-**160**. Cette copule chirale est aisément synthétisée selon une méthode déjà décrite dans la littérature à partir de la (+)-Noréphédrine (+)-**165** par addition de triphosgène et en présence de Et₃N dans le dichlorométhane avec un rendement de 91 % après purification sur colonne de silice (**Schéma 63**).¹²⁷

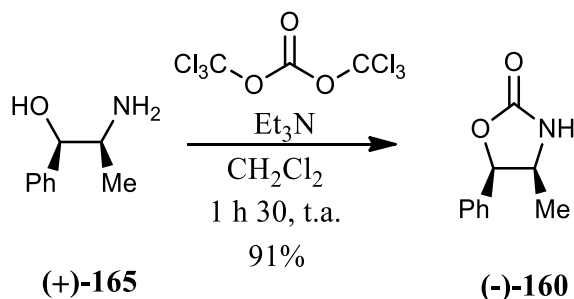


Schéma 63 : Synthèse de la (-)-4-méthyl-5-phényl-2-oxazolidinone.

Le couplage de l'acide (±)-**139** avec l'oxazolidinone (-)-**160** a été effectué selon un mode opératoire déjà décrit.⁹¹ L'acide (±)-**139** a été activé par le chlorure de pivaloyle en présence de Et₃N dans le THF. L'anion lithié de l'oxazolidinone (-)-**160** a ensuite été ajouté au milieu réactionnel pour conduire aux diastéréoisomères (-)-**166a** et (+)-**166b** avec des rendements respectifs de 40 % et 49 % après chromatographie sur colonne de silice (**Schéma 64**).

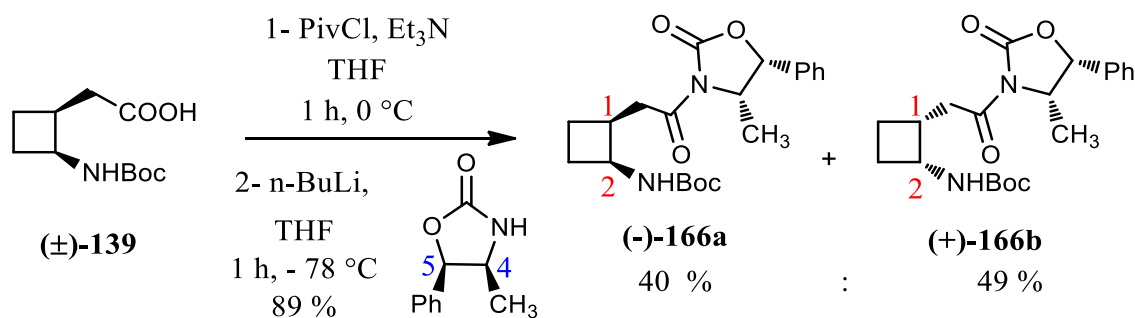


Schéma 64 : Couplage avec l'oxazolidinone.

Afin de déterminer la configuration absolue de chaque dérivé, une analyse du monocristal du diastéréoisomère (+)-166b par diffraction aux rayons-X a été réalisée (**Figure 36**). D'après la configuration absolue de l'oxazolidinone utilisée (4*S*,5*R*), nous avons pu déterminer la configuration absolue du fragment du γ -aminoacide cyclobutanique à savoir (1*R*,2*R*).

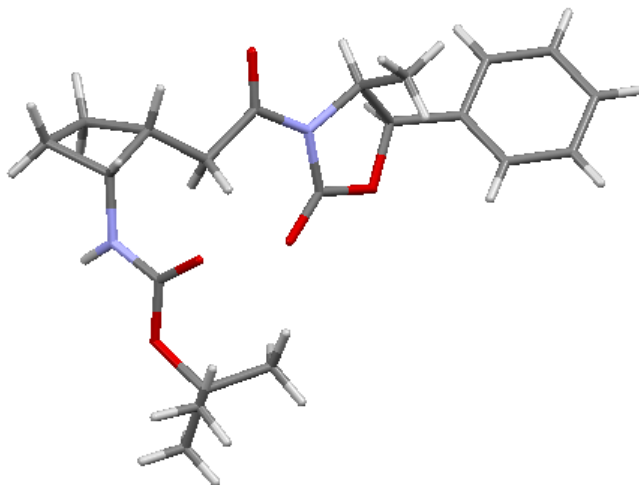


Figure 36 : Structure d'un monocristal du composé (+)-166b par diffraction aux rayons-X.

c- Clivage de la copule chirale et formation des zwitterions

Les diastéréoisomères (-)-166a et (+)-166b ont été traités par du LiOH/H₂O₂ dans un mélange THF/H₂O à température ambiante pendant 16 h et 48 h respectivement. Les aminoacides optiquement actifs (-)-139 et (+)-139 ont ainsi été obtenus avec des rendements de 96 % et 100 % respectivement après chromatographie sur colonne de silice (**Schéma 65**). L'oxazolidinone (-)-160 a été récupérée avec un rendement de 99 %, et réutilisée par la suite.

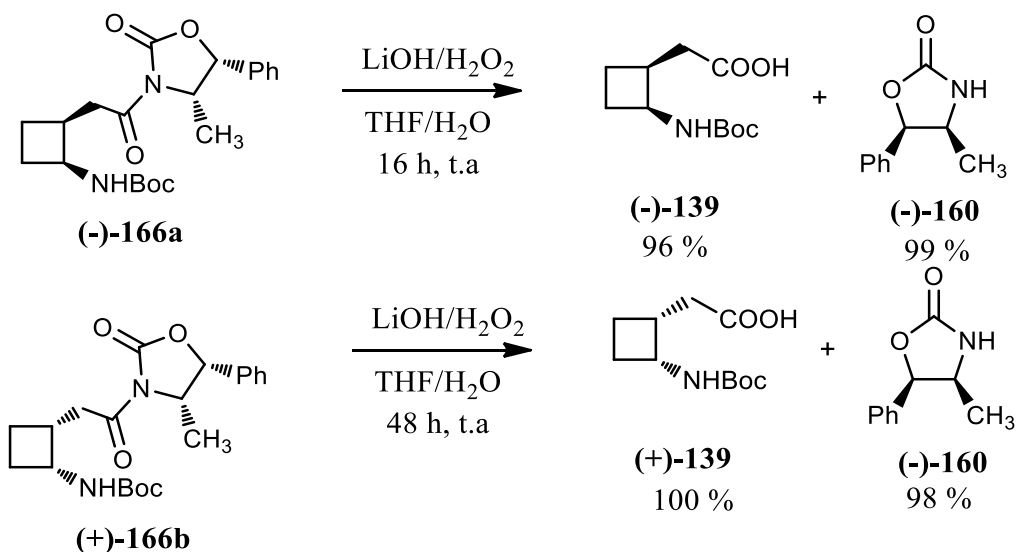


Schéma 65 : Coupure de l'auxiliaire chirale et formation des énantiomères **(-)-139** et **(+)-139**.

La pureté optique de chaque énantiomères a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (CG) sur colonne chirale. Les chromatogrammes obtenus (**Figure 37-Figure 40**) pour les composés **(±)-139**, **(-)-139** et **(+)-139**, présentent le temps de rétention de chaque énantiomère, ainsi que leurs puretés optiques. L'excès énantiomérique du composé **(+)-139** est de 97,2 %, et celui de composé **(-)-138** est de 98,5 %.

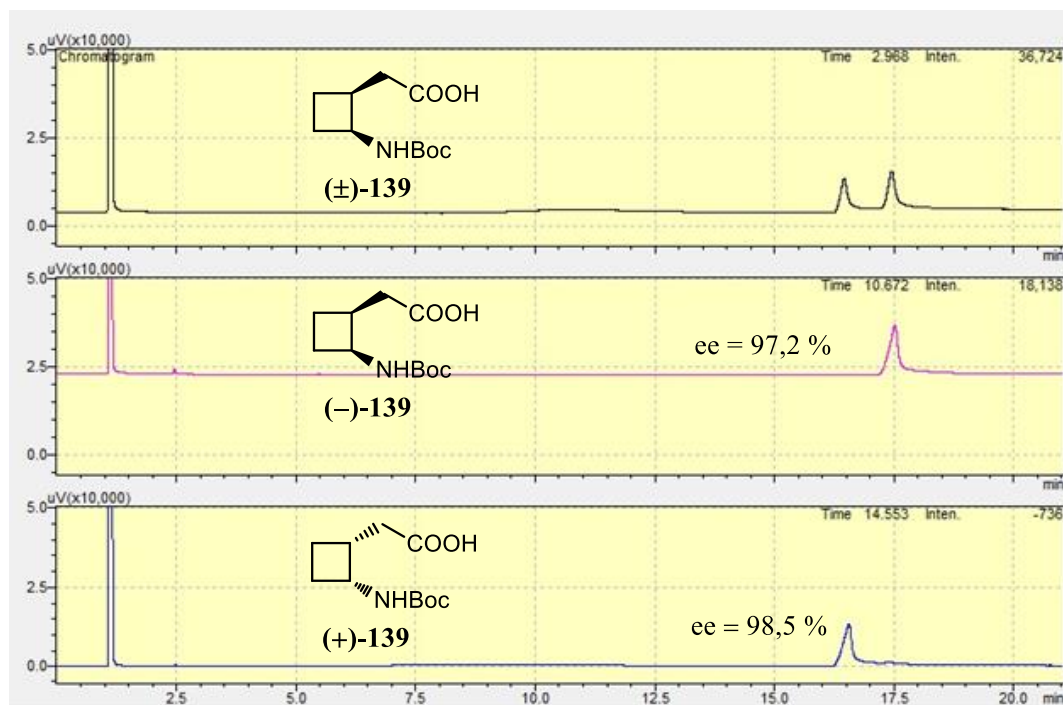


Figure 37 : Chromatogrammes des composés **(±)-139**, **(-)-139** et **(+)-139** montrant le temps de rétention de chaque énantiomère ainsi que son ee.

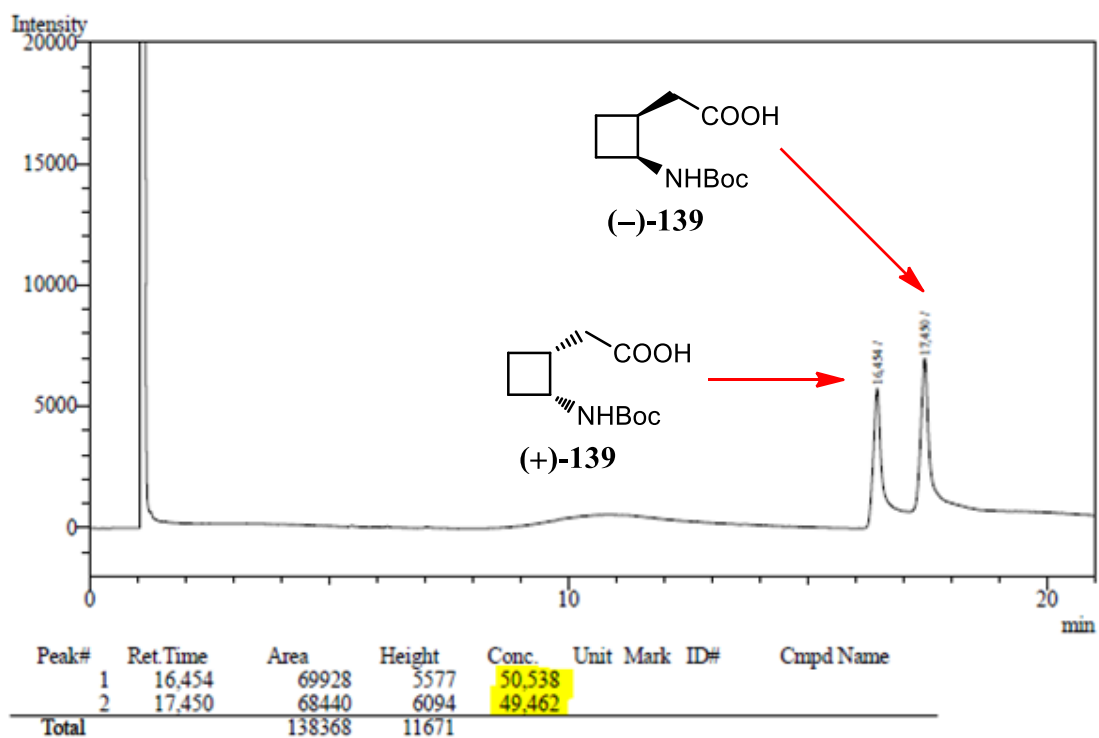


Figure 38 : Chromatogramme du mélange d'énantiomères (±)-139.

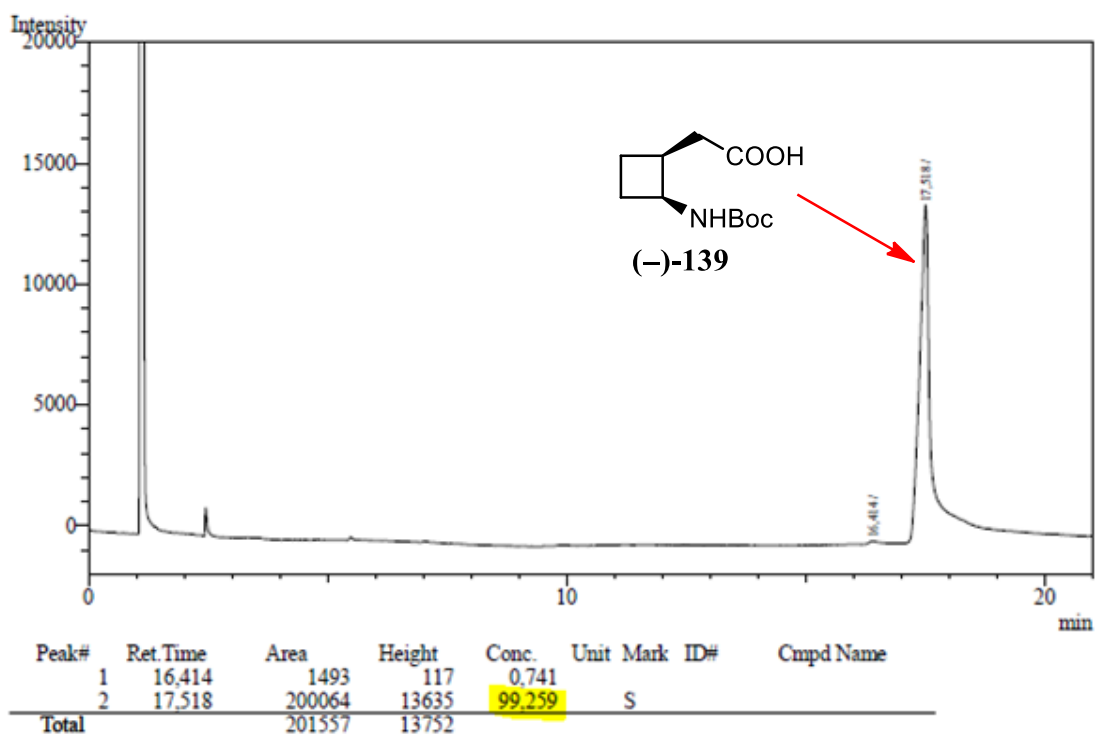


Figure 39 : Chromatogramme du composé (-)-139.

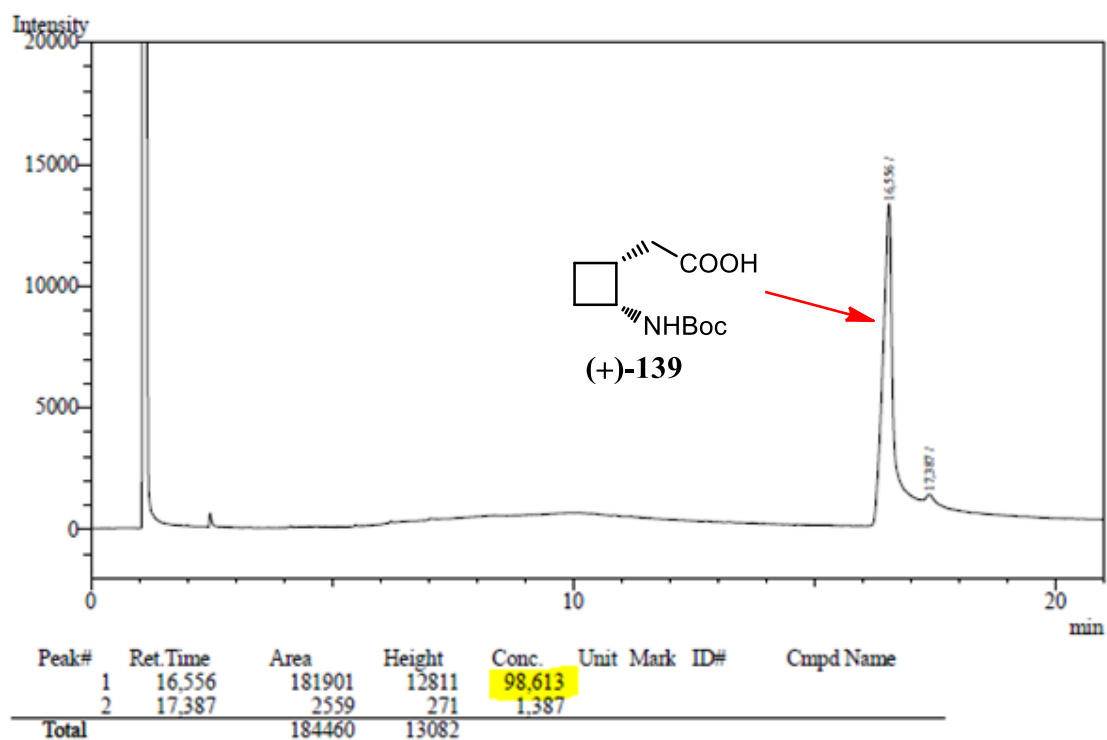


Figure 40 : Chromatogramme du composé (+)-139.

Finalement, les dérivés (–)-139 et (+)-139 ont été traités par 20 eq de TFA dans le CH₂Cl₂, afin de supprimer le groupement Boc. Les deux énantiomères du *cis*-^{3,4}CB-GABA (+)-115 et (–)-115 ont été obtenus avec des rendements de 83 % et 96 % respectivement après passage sur une colonne de résine échangeuse d’ions (**Schéma 66**).

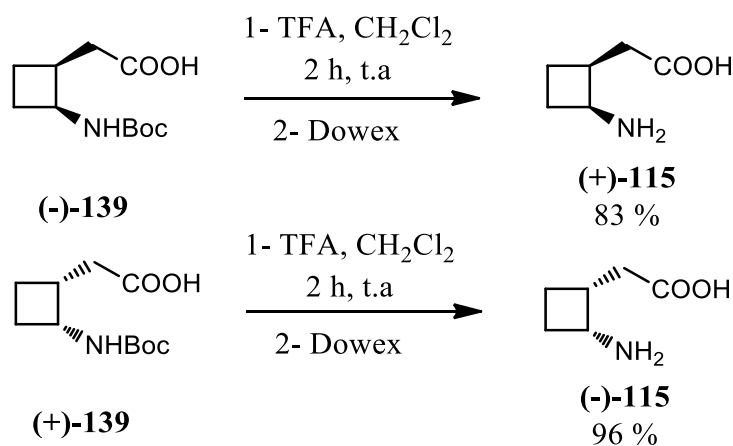


Schéma 66 : Déprotection des aminoacides *N*-Boc optiquement actifs (–)-139 et (+)-139.

En conclusion, nous avons pu obtenir pour la première fois les deux énantiomères optiquement enrichis du *cis*-^{3,4}CB-GABA par deux voies de synthèse efficaces, puis par dédoublement du racémique grâce à un auxiliaire chiral dérivé d'une oxazolidinone.¹²⁸

IV- Synthèse de γ -peptides de *cis*-^{2,3}CB-GABA

A- Synthèse du (–)-*cis*-Boc-^{2,3}CB-GABA

On trouve dans la littérature trois synthèses du *cis*-^{2,3}CB-GABA énantio pur. La première publiée par Orena comporte 8 étapes⁴⁹ (*cf.* p 36) avec un rendement global de 19 %, et la deuxième synthèse est effectuée par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique sur support⁴³ et ne permet d'obtenir qu'un seul énantiomère (*cf.* p 37). La troisième synthèse du *cis*-^{2,3}CB-GABA a été publiée par notre laboratoire⁵⁰ et est basée sur une réaction de photocycloaddition [2+2] entre un γ -lactame insaturé et l'éthylène.

Nous avons préparé le (1*R*,2*S*)-Boc-*cis*-^{2,3}CB-GABA en suivant le protocole expérimental déjà décrit. En faisant réagir le 2,5-diméthoxy-2,5-dihydrofurane **68** avec la (1*S*)-phényléthylamine **69** (**Schéma 67**). Nous avons obtenu les lactames (–)-**70** et **166** avec des rendements respectifs de 59 % et 10 % après chromatographie.

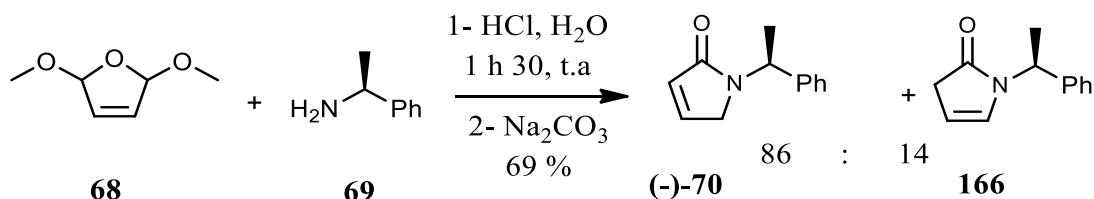


Schéma 67 : Synthèse des lactames conjugués (–)-**70** et déconjugués **166**.

Le lactame déconjugué **166** est instable, et se réarrange en lactame conjugué (–)-**70** en quelques semaines à température ambiante.

Une réaction de photocycloaddition [2+2] a été réalisée sur le lactame conjugué (–)-**70** par irradiation UV avec une lampe à mercure de 400 W, dans un réacteur muni d'un filtre pyrex, pendant 9 h sous barbotage d'éthylène dans l'acétone pour former les cyclo-adduits (–)-**71** et (–)-**72** avec 37 % et 30 % de rendement respectifs après séparation par chromatographie (**Schéma 68**).

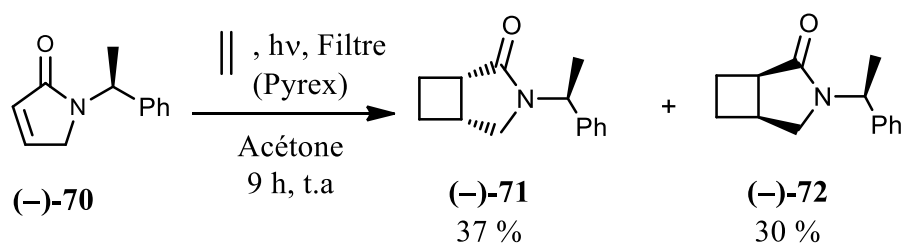
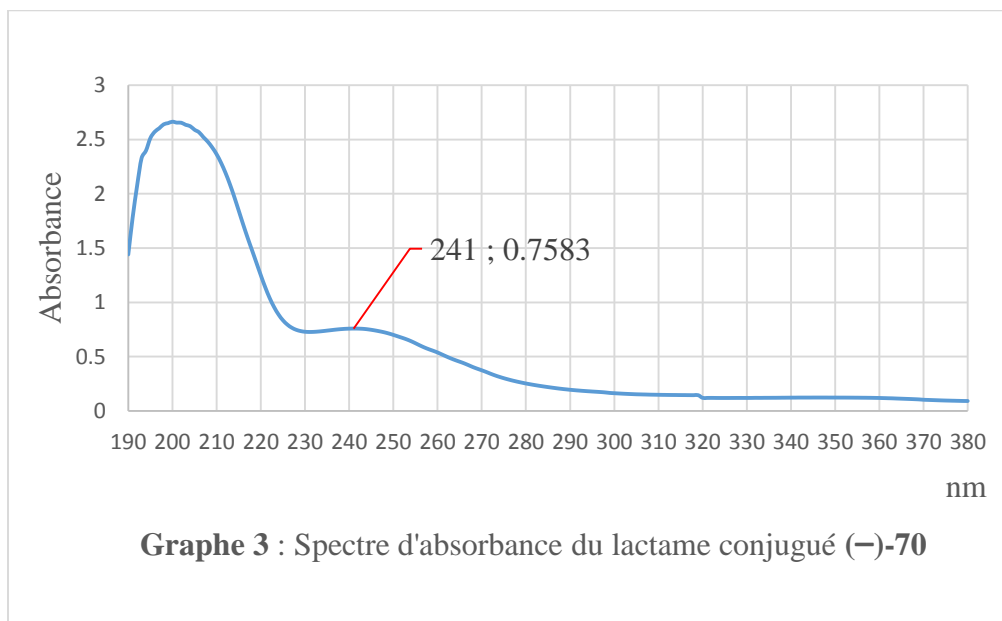


Schéma 68 : Photocycloaddition du lactame conjugué **(-)-70**.

Sur la courbe d'absorbance du lactame conjugué **(-)-70** dans l'acétonitrile à 0.26 mM, on peut voir un maximum d'absorption à 241 nm, avec une faible épaule vers 300 nm (**Graph 3**). Le pyrex ne laissant pas passer les longueurs d'onde < 285 nm, l'acétone a été utilisé comme solvant et comme photosensibilisateur.



La copule chirale du composé **(-)-72** a été clivée, par réaction avec le sodium dans l'ammoniac liquide pour donner le produit **(-)-73**. Celui-ci a été engagé directement dans la réaction suivante sans purification. L'azote du bicycle **(-)-73** a été protégé par le groupement Boc en présence de DMAP dans le CH₃CN pour donner le produit **(-)-74** avec un rendement global de 53 % sur deux étapes après purification sur colonne de silice (**Schéma 69**).

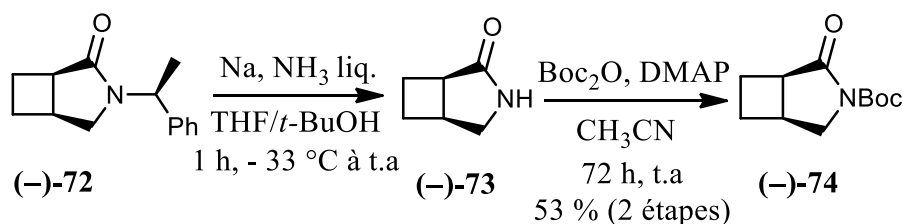


Schéma 69 : Coupure de l'auxiliaire chirale et protection de l'azote.

Le lactame protégé $(-)\text{-74}$ a ensuite été hydrolysé en présence de LiOH dans un mélange THF/H₂O pour conduire à l'acide aminé *N*-protégé $(-)\text{-75}$ avec un rendement de 88 % après purification sur colonne de silice (**Schéma 70**).

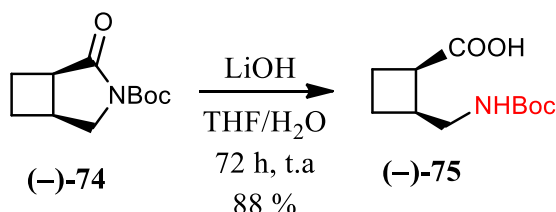


Schéma 70 : Hydrolyse basique du lactame $(-)\text{-74}$.

L'acide aminé *N*-Boc ainsi formé était optiquement pur d'après la mesure de son pouvoir rotatoire et par comparaison avec celui publié dans la littérature ($[\alpha]_D$ obtenu : (C = 0.99; CHCl₃): -17 ; littérature : $[\alpha]_D$ (C = 1; CHCl₃): -15).

V- Synthèse d'oligomères de *cis*-^{2,3}CB-GABA

Afin de réaliser des couplages peptidiques à partir du $(-)\text{-cis-Boc-}^{2,3}\text{CB-GABA } (-)\text{-75}$ pour former des oligomères (di, tri, tétra, et hexamères), deux monomères de départ devaient être préparés : un acide aminé *N*-protégé et un aminoester *C*-protégé. Dans un premier temps, nous avons choisi l'ester méthylique comme groupement protecteur du côté C-terminal, puis nous sommes passés à l'ester benzylique pour un suivi des réactions et un isolement des produits plus aisé (**Schéma 71**).

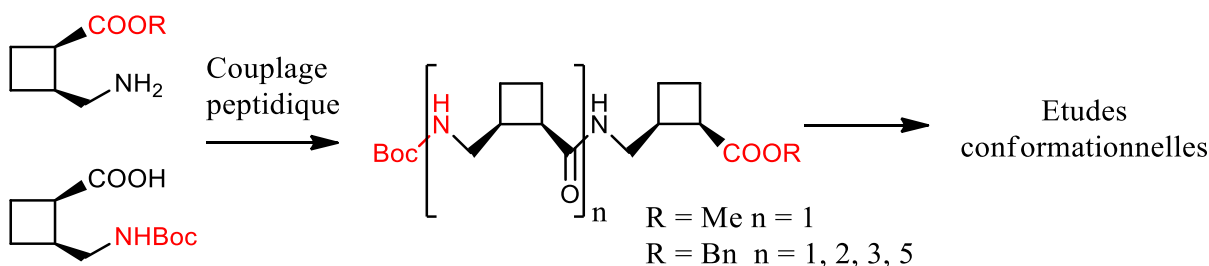


Schéma 71 : Stratégie de couplage peptidique et objectifs.

A- Synthèse des blocs de construction

Le bloc de synthèse C-protégé **167** a été synthétisé à partir du Boc-aminoacide (–)-**75** par une réaction tandem estérification/déprotection en présence de TMSCl dans le MeOH (**Schéma 72**). Le produit brut a été engagé dans la réaction de couplage suivante sans purification.

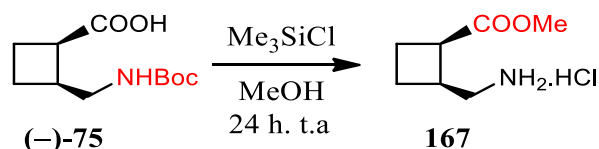


Schéma 72 : Synthèse de l'amine **167**.

Nous avons changé l'estér méthylique par un ester benzylique pour faciliter son identification sur plaques CCM et faciliter ainsi la purification du dipeptide correspondant. Pour cela, nous avons réalisé une estérification de la fonction acide du composé (–)-**75** suivant des conditions classiques,¹²⁹ en présence d'alcool benzylique, de DCC et de DMAP dans le dichlorométhane pour obtenir l'estér (–)-**168** avec un rendement de 98 % après purification par chromatographie sur colonne de silice. La déprotection de la fonction amine a été effectuée par réaction avec le TFA dans le dichlorométhane pour conduire au produit **169**, qui a ensuite été utilisé directement pour la réaction de couplage (**Schéma 73**).

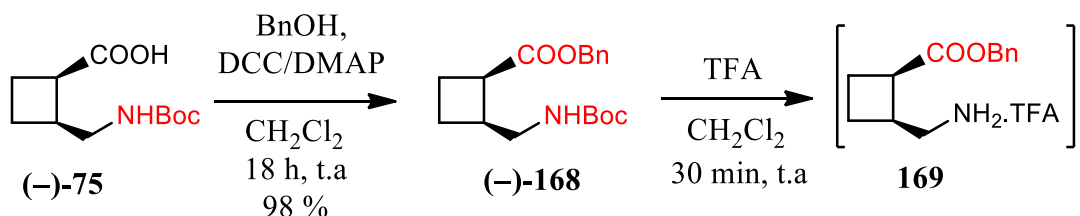


Schéma 73 : Synthèse de l'amine (–)-**168** puis déprotection de l'amine.

B- Synthèse des dipeptides (–)-170 et (–)-171

Deux dipeptides ont été synthétisés en couplant l'acide N-protégé (–)-**168** avec chacun des aminoesters **167** et **169** (**Schéma 74**).

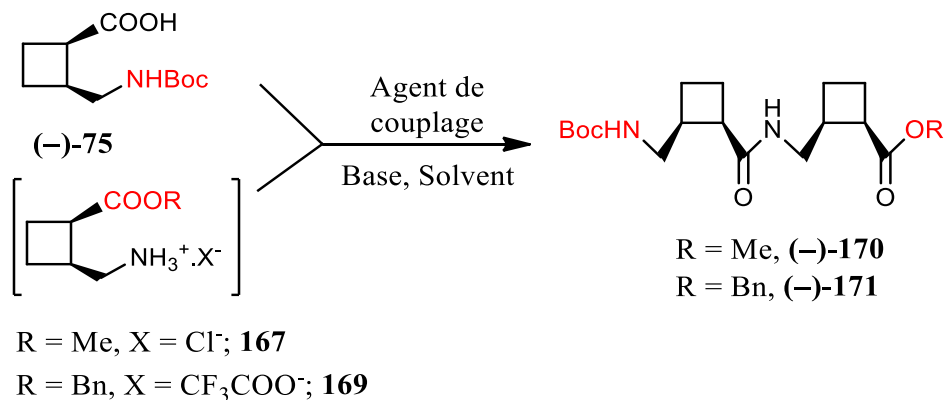


Schéma 74 : Couplage peptidique pour former les dipeptides **(-)-170** et **(-)-171**

Inspiré par les conditions de couplage de l'ACBC,¹³⁰ nous avons réalisé le couplage de l'acide aminé *N*-Boc **(-)-75** avec l'aminoester **167**, en présence d'un équivalent de HOBt.H₂O, 1,5 équivalent d'EDCI.HCl et 3 équivalents de triéthylamine dans du DMF (*entrée 1* du **Tableau 3**). Après 72 h d'agitation à température ambiante, nous avons obtenu le dimère **(-)-170** avec un rendement de 37 % après purification par chromatographie, ainsi que d'autres produits non identifiables. Vu la difficulté de purification du dipeptide **(-)-170**, nous étions passé à la synthèse du dimère **(-)-171**. Différentes conditions de couplage peptidique ont été utilisées afin d'optimiser la formation du dipeptide **(-)-171** (**Schéma 74**).

Nous avons sélectionné différents réactifs de couplage, et les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Conditions de couplage

Entrée	Réactifs de couplage (éq.)	Solvant	Base (éq.)	T °C	Temps	Rdt (Produit)
1	EDCI.HCl (1.5) / HOBt.H ₂ O (1.2)	DMF	Et ₃ N (3)	t.a.	72 h	37 % (-)-170
2	EDCI.HCl (1.5) / HOBt.H ₂ O (1.2)	DMF	Et ₃ N (8)	t.a.	72 h	32 % (-)-171
3	IBCF (1)	DMF	Et ₃ N (4)	t.a.	72 h	53 % (-)-171
4	EDCI.HCl (2.7) / DMAP (1)	DMF	Et ₃ N (4)	t.a.	72 h	37 % (-)-171
5	HATU (1.3)	DMF/CH ₂ Cl ₂ (20:1)	DIPEA (5)	t.a.	72 h	77 % (-)-171

Les premières conditions opératoires que nous avons utilisées pour effectuer le couplage peptidique, ont été EDCI.HCl (1,5 eq), HOBt.H₂O (1,2 eq) en présence de Et₃N (8 eq) à température

ambiante dans le DMF (*Entrée 2*). Cette méthode n'a permis d'isoler le dipeptide (–)-**171** qu'avec un rendement de 32 % après chromatographie. L'activation de l'acide a ensuite été faite par l'IBCF (1 éq) et par EDCI.HCl (2,7 éq) en présence de DMAP (1 éq). Nous avons pu isoler après chromatographie le dipeptide (–)-**171** avec 53 % et 37 % de rendement respectivement (*Entrées 3* et *4*). En dernier lieu, nous avons testé l'agent de couplage HATU (*Entrée 5*).¹³¹ Celui-ci a été mis en réaction avec l'acide (–)-**75** avec l'ester **169** en présence de DIPEA (5 éq) ce qui a conduit au dipeptide (–)-**171** avec un rendement de 77 % après chromatographie.

Ces conditions donnant le meilleur rendement, nous les avons utilisées pour la préparation des oligomères à plus longue chaîne.

C- Synthèse du tripeptide (–)-**173**

La synthèse du tripeptide (–)-**173** peut s'envisager par deux voies A et B (**Schéma 75**).

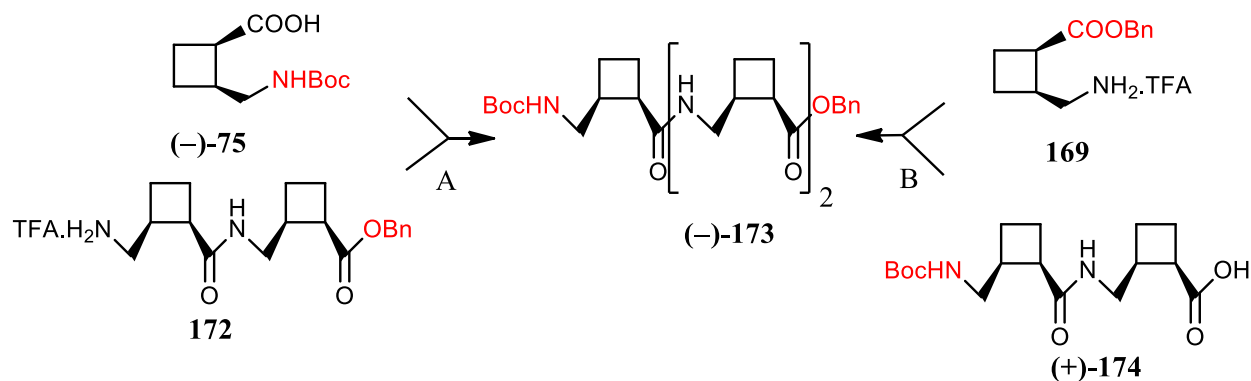


Schéma 75 : Options de couplage peptidique (A et B) pour former le trimère (–)-**173**.

Puisque nous avons à notre disposition l'acide (–)-**75**, nous avons décidé de déprotéger l'amine du dimère (–)-**171**, afin de les coupler ensemble et former le tripeptide (–)-**173** (voie A). Un échantillon du dimère (–)-**171** a donc été déprotégé du côté *N*-terminal en présence du TFA dans le dichlorométhane, pour donner le sel **172**. Celui-ci a été engagé directement dans le couplage avec l'acide (–)-**75** dans un mélange DMF/CH₂Cl₂ (20:1), en présence de HATU et de DIPEA. Après 72 h d'agitation à température ambiante, le brut réactionnel a été purifié par chromatographie, et nous avons isolé le tripeptide (–)-**173** avec un rendement de 82 % (**Schéma 76**).

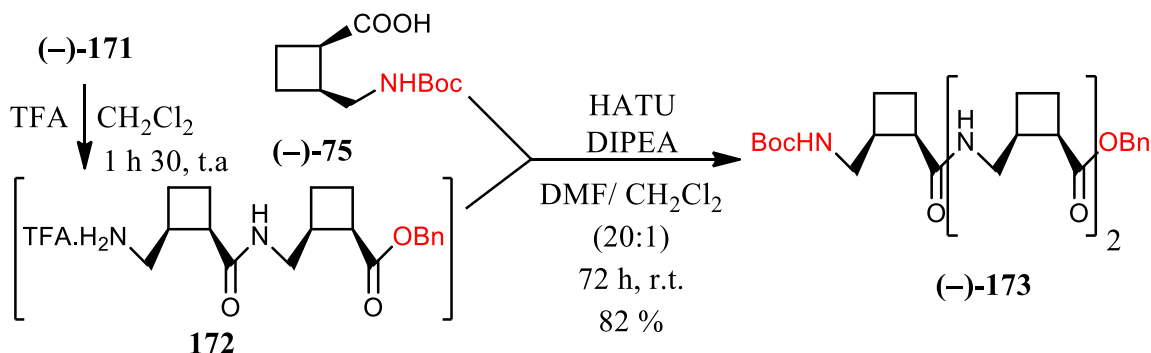


Schéma 76 : Couplage peptidique pour former le trimère (-)-173.

Le tripeptide ester (-)-173 a ensuite été débenzylé par hydrogénation catalytique en présence de Pd/C dans le dichlorométhane (**Schéma 77**). L'acide (+)-175 a été obtenu avec un rendement brut de 79 %. Sa très grande polarité n'a pas permis sa purification par chromatographie.

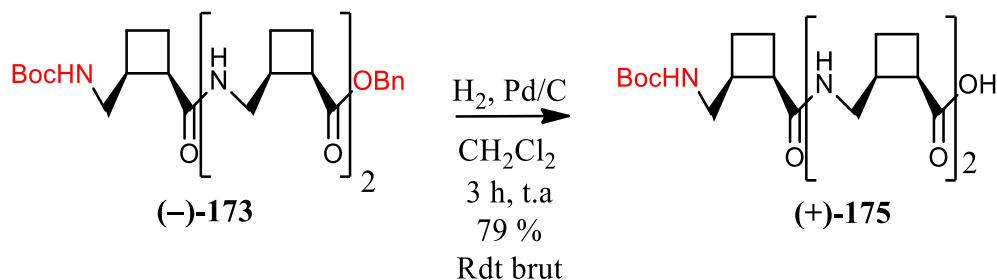


Schéma 77 : Débenzylation du tripeptide (-)-173.

D- Synthèse des tétrapeptides 177 et (-)-178

Nous avons réalisé une saponification du dipeptide (-)-170 par action de 10 équivalents de lithine à température ambiante pour fournir le dipeptide acide (+)-174 avec un rendement brut de 55 % (**Schéma 78**). Le trifluoroacétate d'ammonium 176 a ensuite été obtenu à partir du dipeptide (-)-170 par réaction avec 30 équivalents de TFA dans le dichlorométhane. Après élimination de l'excès d'acide trifluoroacétique, le composé 176 a été engagé directement dans la réaction de couplage.

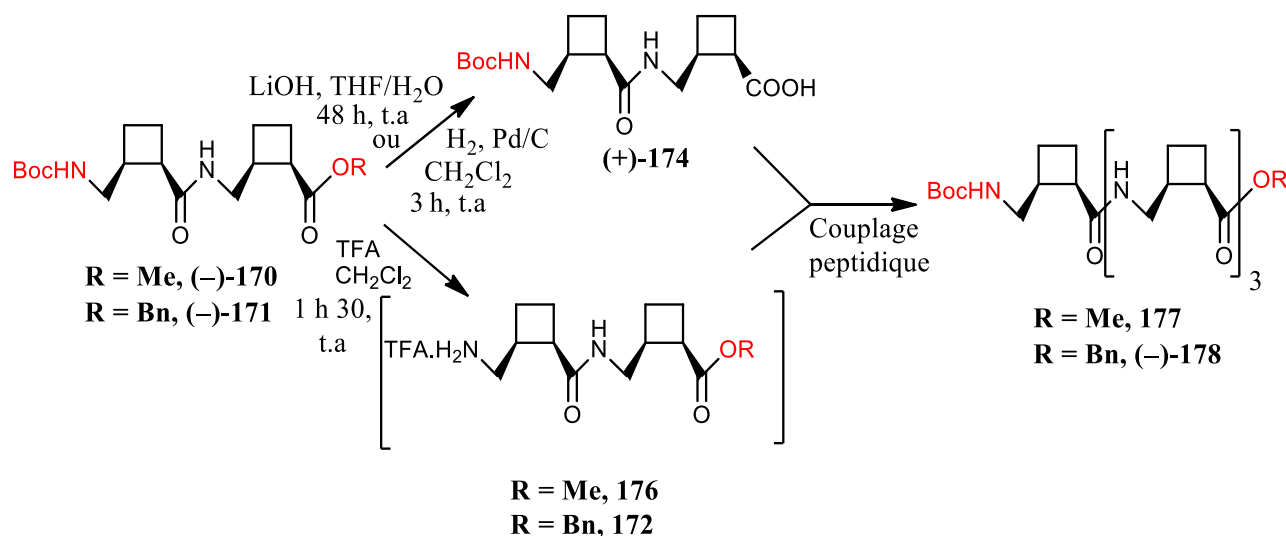


Schéma 78 : Stratégie de synthèse des tétrapeptides.

Le couplage entre l'acide (+)-**174** et le sel d'ammonium **176** réalisé en présence d'IBCF (1 éq) et de Et₃N (4 éq) dans le DMF n'a pas conduit au tétrapeptide escompté. Nous avons retrouvé les composés de départ inchangés même après 72 h à température ambiante.

Un échantillon du dipeptide (-)-**171** a été débenzylé par hydrogénation catalytique dans le dichlorométhane pour fournir le dipeptide acide (+)-**174**, qui a été ensuite engagé sans purification dans le couplage suivant. Un autre échantillon du dimère (-)-**171** a été soumis à un traitement avec le TFA dans le dichlorométhane pour déprotéger la partie N-terminale. Le produit intermédiaire **172** n'a pas été isolé, et il a été engagé dans la réaction de couplage avec le dipeptide acide (+)-**174** dans un mélange DMF/CH₂Cl₂ (20:1) en présence de HATU (1.3 éq) et du DIPEA (6 éq). Ainsi, le tétrapeptide (-)-**178** a été formé avec un rendement de 68 % (**Schéma 78**).

Le tétrapeptide obtenu a présenté une forte tendance à gélifier dans différents solvants ce qui a rendu sa caractérisation et sa manipulation difficile.

E- Synthèse de l'hexamère 180

Comme nous avons à notre disposition le dipeptide (-)-**171** et le tétrapeptide (-)-**178**, nous avons essayé de coupler ces deux partenaires pour former l'hexapeptide. Le tétrapeptide (-)-**178** a été débenzylé par hydrogénation catalytique dans le dichlorométhane pour donner l'acide (+)-**179** (**Schéma 79**). Le produit (+)-**179** a été utilisé dans la réaction de couplage sans purification. Des travaux de caractérisation du (+)-**179** sont en cours au laboratoire.

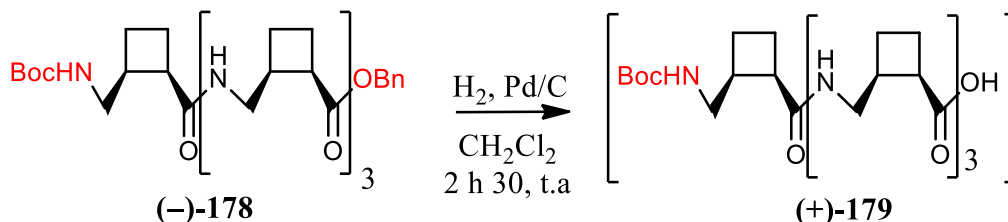


Schéma 79 : Débenzylation du tetrapeptide (-)-178.

Un couplage peptidique a été réalisé entre l'acide (+)-179 et l'amine 172 en présence de HATU et de DIPEA dans un mélange DMF/CH₂Cl₂ (3:1) en 72 h d'agitation à température ambiante. Des traces de l'hexapeptide 180 ont été identifiées par spectrométrie de masse. Nous avons répété la réaction de couplage dans le DMF, en prolongeant le temps de réaction jusqu'à une semaine. Le brut obtenu a été purifié par chromatographie et des traces d'hexapeptide 180 ont été identifiées par spectrométrie de masse (**Schéma 80**).

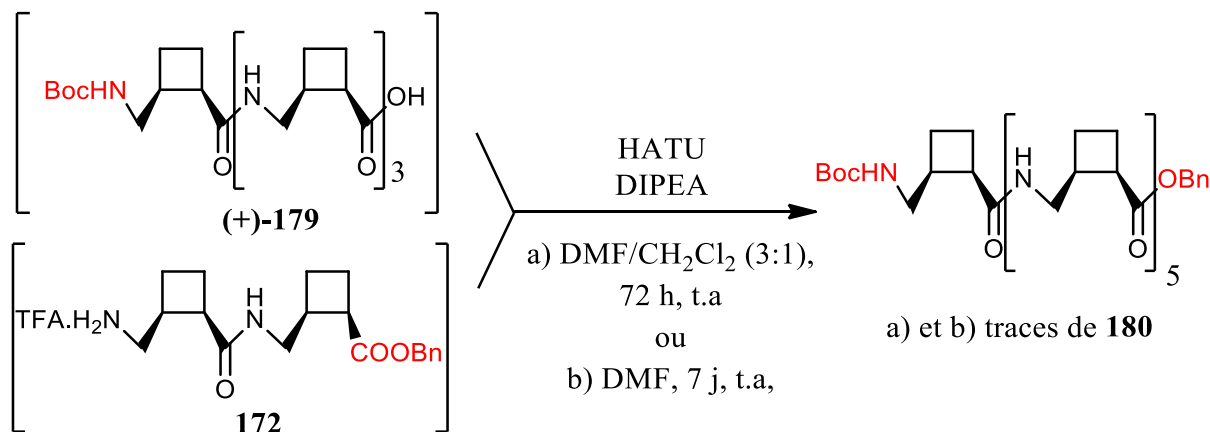


Schéma 80 : Synthèse de l'hexapeptide 180.

Ainsi, avec des méthodes de couplage adaptées, nous avons pu préparer les di-, tri- et tetrapeptide *N*-Boc (-)-170, (-)-171, (-)-173 et (-)-178. Ces oligomères ont été purifiés par chromatographie sur gel de silice et se sont montrés stables à l'air et à température ambiante. Les dipeptides peuvent être cristallisés, et ils sont facilement solubles dans les solvants halogénés, alors que le tripeptide et le tétrapeptide ont tendance à former des gels dans ces solvants. Nous avons aussi préparé les trois peptides acides (+)-174, (+)-175 et (+)-179. Les di-, tri- et tetrapeptide (-)-170, (-)-171, (-)-173 et (-)-178 ont été caractérisés alors que leurs formes acides (+)-174, (+)-175 et (+)-179 sont en cours de caractérisation au laboratoire. Des analyses conformatinnelles ont été effectuées sur les di et tetrapeptides (-)-170, (-)-171 et (-)-178, ainsi que quelques études sur le tripeptide (-)-173.

VI- Analyses conformationnelles des oligomères

Nous avons présenté dans l'introduction générale les différentes structures que peuvent adopter les peptides. Ces structures peuvent être mises en évidence par l'utilisation de différentes techniques d'analyses complémentaires. Les techniques spectroscopiques les plus utilisées sont la résonance magnétique nucléaire (RMN), l'infrarouge (IR), le dichroïsme circulaire (DC), ainsi que la microscopie à balayage électronique (MEB) et les rayons X (RX). Dans cette partie, nous allons détailler les différentes méthodes utilisées pour caractériser les oligomères que nous avons préparés.

Hofmann et coll.⁷⁷ ont réalisé une étude théorique par modélisation moléculaire sur un γ -hexapeptide modèle non substitué (*cf.* p 49), afin de trouver les structurations repliées les plus stables de ce composé. D'après Hofmann, les oligomères des α - et β -peptides ayant des pseudo-cycles de petites tailles tendent à former des feuillets ou des rubans, alors que ceux qui possèdent des pseudo-cycles de grandes tailles tendent à former des hélices. Or chez un γ -peptide, une structuration en pseudo-cycle de petite taille est plus favorisée que dans un α - et β -peptides. Effectivement, Hofmann a prédit la formation de pseudo-cycles de plusieurs tailles, le plus stable correspondant à une hélice à 9 chaînons. Il ajoute qu'afin d'éviter la formation de pseudo-cycles à petites tailles, et favoriser la formation d'hélices, une double liaison *trans* (*E*) devrait être introduite entre $C\alpha$ et $C\beta$ du γ -aminoacide.

A- Analyse par diffraction des Rayons-X

Les rayons X permettent de déterminer une structuration régulière à l'état solide. D'après Alezra et coll.¹³² les petits peptides ont toujours été négligés et sous-estimés, et considérés incapables d'adopter des structurations secondaires bien définies. Cependant plusieurs structures cristallographiques de di- ou tripeptides contenant des γ - et α -aminoacides ont été décrites, montrant la présence de liaisons hydrogène qui forment des pseudo-cycles en C-7 et C-9.^{133,134}

Nous avons pu obtenir un monocristal du composé (–)-**168** qui a été analysé par diffraction aux rayons X. L'angle ζ a été déterminé sur le monomère Boc-*cis*-^{2,3}CB-GABA-OBn (–)-**168** et sa valeur est de -24,58° (**Figure 41**).

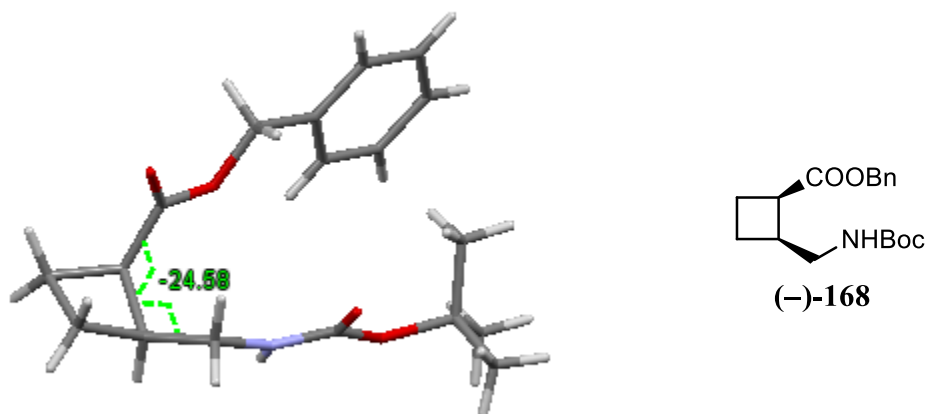


Figure 41 : Structure du monocristal de l'amineester *N*-Boc (-)-**168**. L'angles ζ montré en vert est égale à $-24,58^\circ$.

L'angle de torsion ζ de l'amineester *N*-Boc (-)-**168** ne correspond à aucun des angles trouvés par Hofmann pour les structures de plus basses energies. Cependant l'amineester *N*-Boc (-)-**168** tend à former des liaisons intermoléculaires (**Figure 42**).

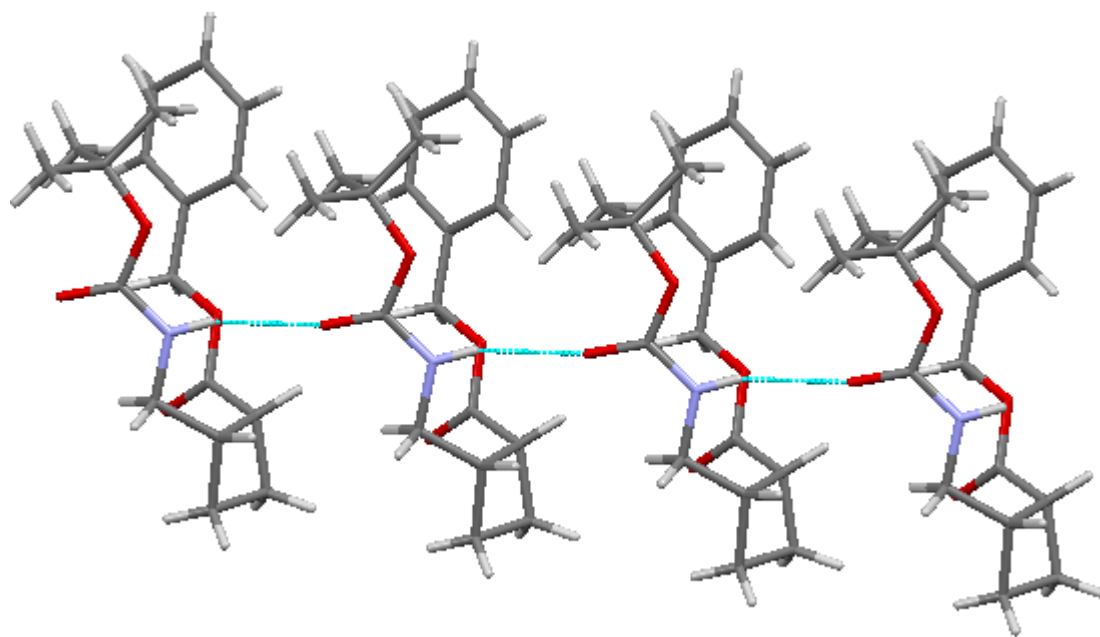


Figure 42 : Formation de liaisons intermoléculaires (en bleu) pour l'amineester *N*-Boc (-)-**168**.

Les deux dipeptides synthétisés (–)-**170** et (–)-**171** ont été cristallisés dans le dichlorométhane par diffusion d'ether de pétrole. Les deux structures cristallines des deux esters méthylique (–)-**170** et benzylique (–)-**171** adoptent la même conformation étendue (

Figure 43).

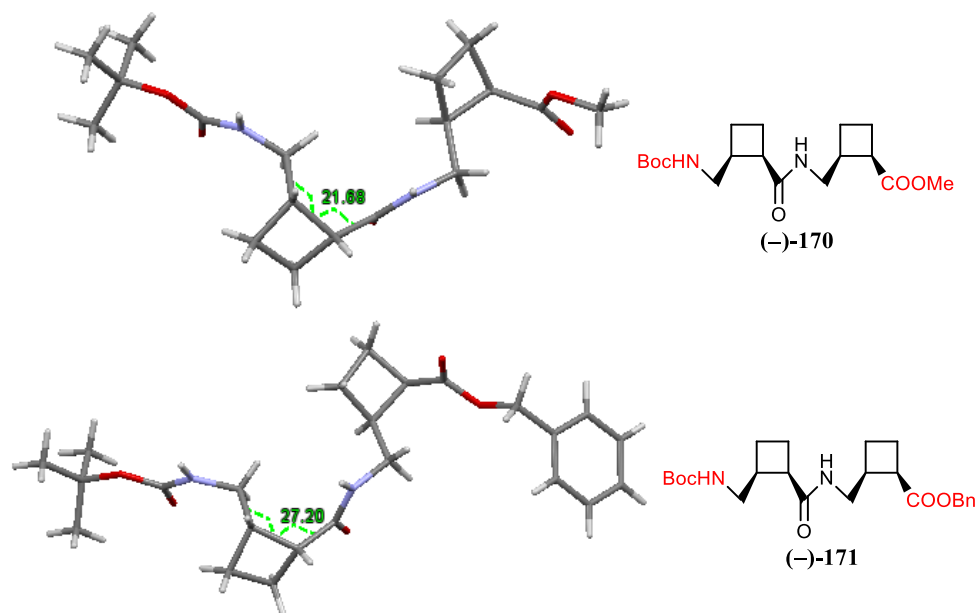


Figure 43 : Structures des monocristaux des dipeptides (–)-**170** (haut) et (–)-**171** (bas) par diffraction aux rayons X. Les angles ζ sont montrés en vert.

On observe des liaisons intermoléculaires, et par suite une structuration en feuillets antiparallèles pour le dipeptide (–)-**170** (**Figure 44**) et le dipeptide (–)-**171** (**Figure 45**).

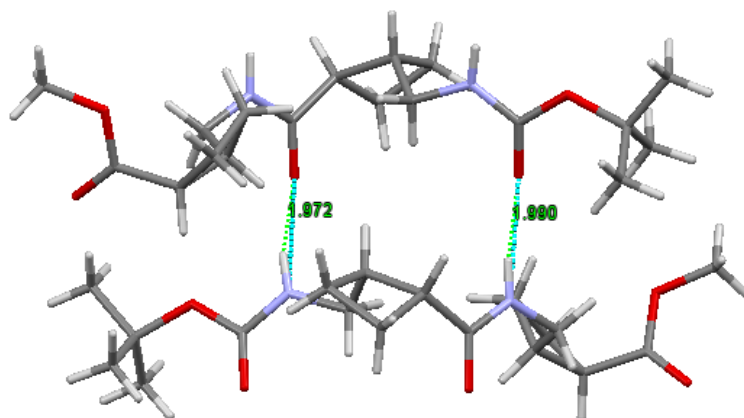


Figure 44 : Arrangement des molécules du dipeptide (–)-**170** en feuillets antiparallèles (liaisons hydrogène en bleu égales à 1.9 Å).

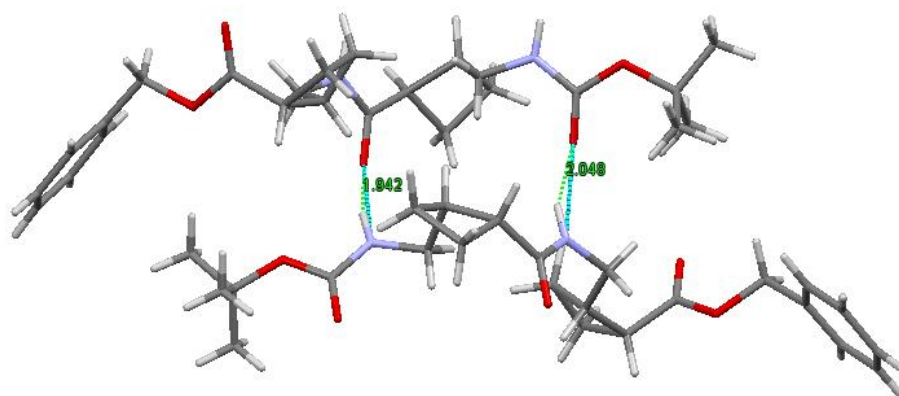


Figure 45 : Arrangement des molécules du dipeptide (–)-**171** en feuillets antiparallèles (liaisons hydrogène en bleu égales à 1.9 et 2.0 Å).

Le tripeptide (–)-**173** et le tetrapeptide (–)-**178** n'ont pas pu être cristallisés. Nos tentatives effectuées dans le toluène, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et l'acétonitrile ont conduit à la formation de gels.

B- Etude par RMN

Pour déterminer la structuration d'une molécule en solution, la RMN à une et deux dimensions est en principe la plus puissante des méthodes spectroscopiques. Pour cela, il est nécessaire d'attribuer chaque proton à un signal du spectre de RMN ^1H et de même pour les carbones. Les principales techniques utilisées sont les expériences de corrélation par les couplages scalaires (COSY ou **C**ORrelated **S**pectroscop**Y**, la TOCSY ou **T**otal **C**ORrelated **S**pectroscop**Y**, l'HSQC ou **H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence, et l'HMBC ou **H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond

Correlation, etc...), et celle à travers l'espace (NOESY Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, etc...). Les expériences d'échanges isotopiques permettent aussi de mettre en évidence l'existence de liaisons hydrogènes intramoléculaires dans un peptide. Afin de réaliser cette expérience, un solvant protique deutéré comme le CD₃OD servant de source isotopique est utilisé, et l'avancement de l'échange isotopique dans le temps est suivi par spectroscopie RMN ¹H.

Nous avons effectué une étude conformationnelle des oligomères (-)-**170**, (-)-**171**, (-)-**173** et (-)-**178** par RMN 1D et 2D.

Nous avons commencé par la recherche d'un solvant deutéré capable de dissoudre les oligomères et également de fournir un spectre RMN 1D avec des signaux bien séparés. Le chloroforme deutéré a été choisi pour effectuer l'analyse du dimère (-)-**170** et du tétramère (-)-**178**, et le benzène pour le dimère (-)-**171**. Les spectres RMN 1D et 2D des dipeptides nous ont permis d'attribuer tous les pics de protons et carbones grâce à des expériences COSY, TOCSY, HSQC ¹H-¹³C, HMBC ¹H-¹³C effectuées sur chacun des oligomères.

a- Le dipeptide (-)-**170**

La **Figure 46** représente le spectre RMN du ¹H à 400 MHz du dipeptide (-)-**170** dans le CDCl₃ à 20 mM. Cette concentration a été choisie afin d'éviter la formation d'agrégats. Nous pouvons noter la bonne séparation des signaux des NH, alors que la région des H α , H β , H γ et celle des Hb et Hc montre des recouvrements des signaux.

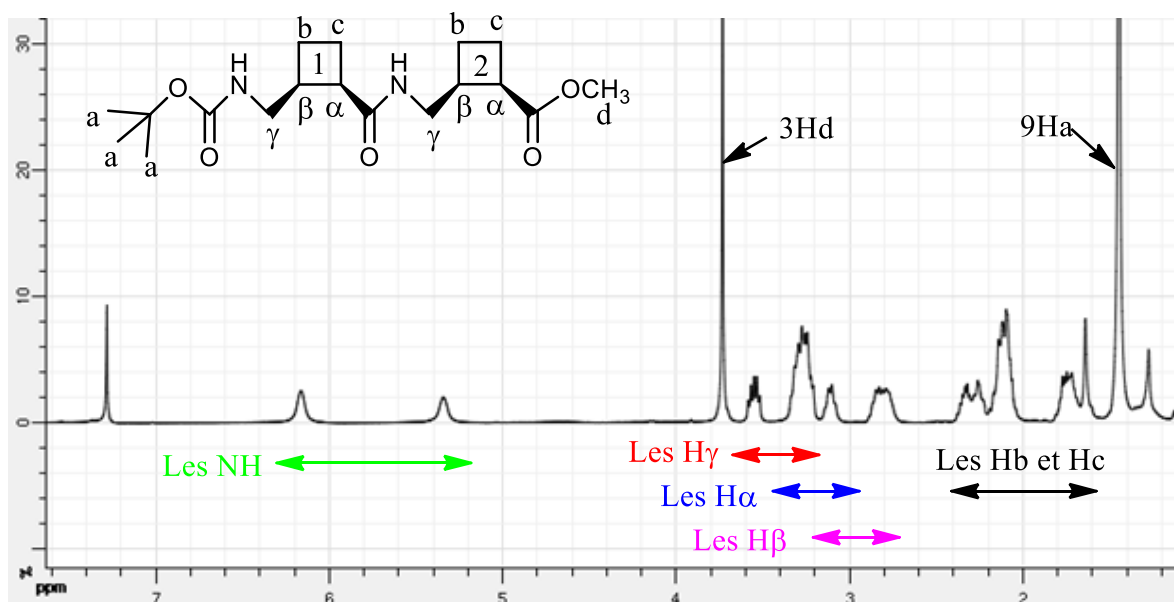


Figure 46 : Spectre RMN ¹H à 400 MHz du dipeptide (-)-**170** dans le CDCl₃.

Afin de pouvoir attribuer un proton à chaque signal, nous avons effectués plusieurs expériences spectroscopiques. La TOCSY nous a permis de voir les couplages scalaires dans le dipeptide. Cette technique spectroscopique est utile dans le cas de recouvrement des signaux de protons. Ainsi, nous avons pu séparer les signaux de protons enchevêtrés en appliquant la TOCSY sur le dipeptide (–)-**170** et nous avons obtenu deux spectres (en bleu et en vert) qui correspondent à chacun des blocs du dipeptide (**Figure 47**). Ensuite, nous avons attribué chaque spectre au résidu correspondant. Pour cela, nous avons réalisé l'expérience d'HMBC qui permet de montrer les corrélations entre les carbones et les protons séparés entre eux par deux ou trois liaisons (**Figure 48**). Connaissant le déplacement chimique de chaque carbonyle (C_A , C_B et C_C) du dipeptide (–)-**170**, leurs corrélations avec les protons voisins (H_{1-5}) nous ont permis d'attribuer les spectres de TOCSY avec chacun des blocs du dipeptide, et par suite, nous avons pu attribuer un proton à chaque signal (

Tableau 4).

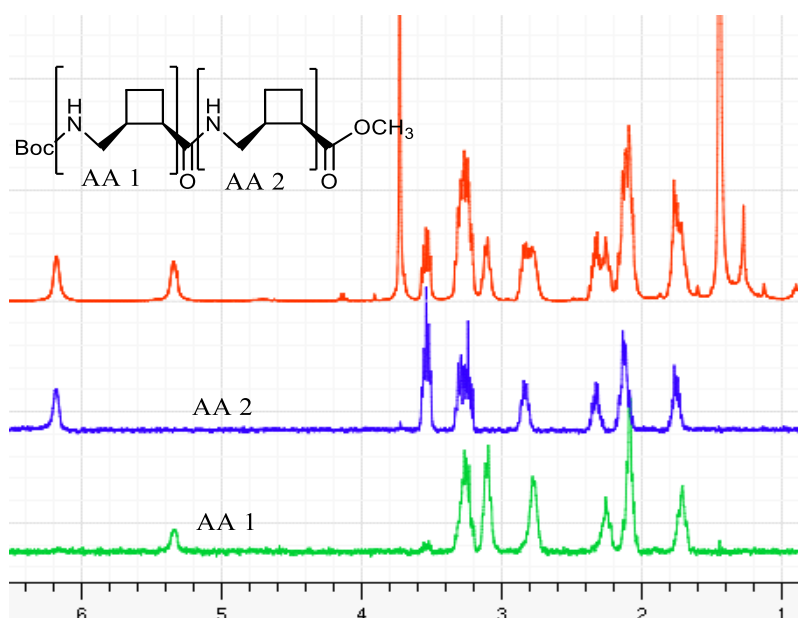


Figure 47 : Spectres TOCSY (en bleu et en vert) à 400 MHz du dipeptide (–)-**170** montrant les couplages scalaires dans chacun des blocs du dipeptide. En rouge, le spectre de ^1H du dipeptide (–)-**170**.

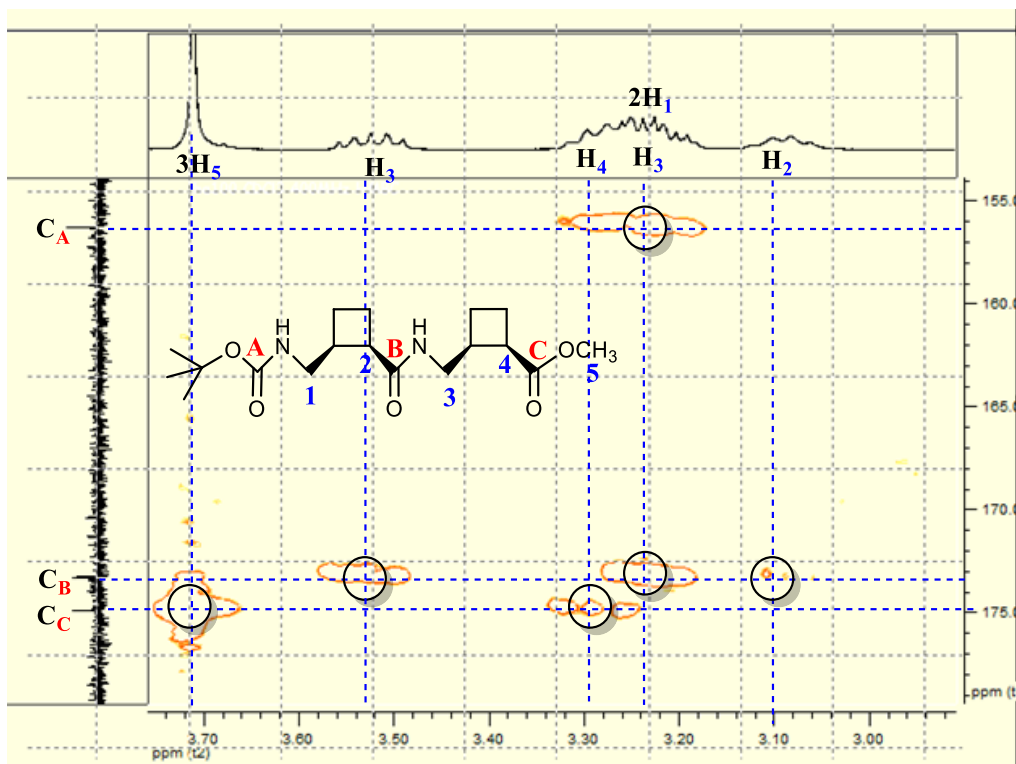


Figure 48 : Spectre HMBC à 400 MHz du dipeptide (–)-**170**.

Tableau 4 : Déplacements chimiques en ppm des NH, H α , H β , H γ , Hb et Hc du dipeptide (–)-**170**.

Aminoacide	NH	H α	H β	H γ	Hb	Hc
1	5,31	3,10-3,12	3,21-3,31	3,21-3,31 3,52-3,58	2,06-2,14 2,25-2,33	1,70-1,77 2,06-2,14
2	6,15	3,21-3,31	2,77-2,83	3,52-3,58	2,06-2,14 2,25-2,33	1,70-1,77 2,06-2,14

Nous avons effectué des mesures d'échange isotopique par RMN par ajout de CD₃OD. Pour cela, un volume de 25 μ L de CD₃OD a été introduit dans un tube RMN contenant le dipeptide (–)-**170** à 20 mM dans le CDCl₃ (500 μ L). Cette concentration a été choisie afin d'éviter la formation d'agrégats. La **Figure 49** présente l'évolution des signaux des NH du dipeptide (–)-**170** après ajout de CD₃OD et sur une période de 90 min. On observe que le proton H-1 atteint la demi-extinction au bout de 30 minutes alors que l'échange du proton H-2 avec le deutérium est un peu plus lente, et atteint 30 % d'extinction en 90 minutes. La vitesse d'échange des deux protons NH montre que ces protons sont facilement échangeables, et qu'aucune liaison intramoléculaire n'est impliquée.

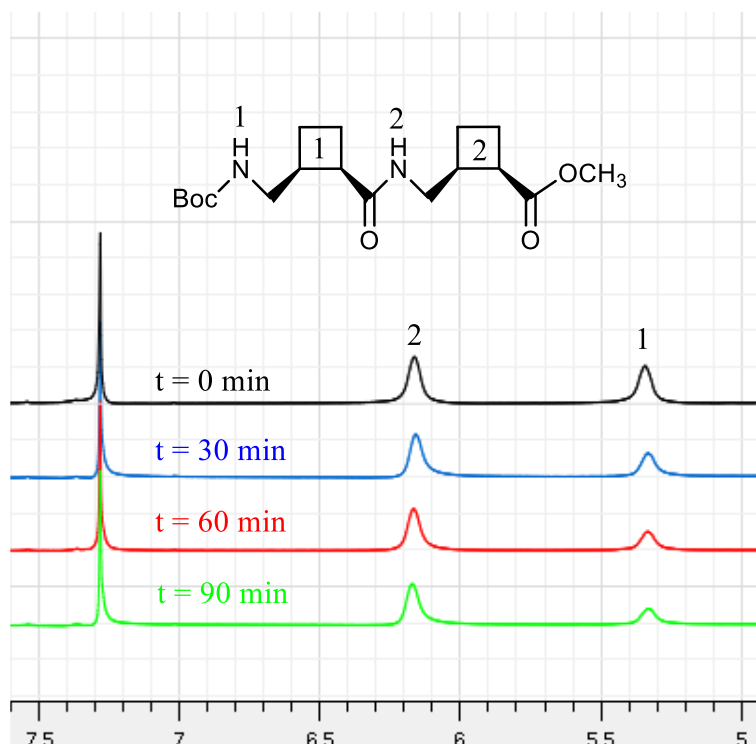


Figure 49 : Variation isotopique des NH du dipeptide (–)-**170** par ajout de CD₃OD.

b- Le dipeptide (–)-**171**

La **Figure 50** représente le spectre RMN du ¹H à 400 MHz du dipeptide (–)-**171** dans le C₆D₆ à 20 mM. Nous avons pu attribuer chaque massif à un proton de la molécule (**Tableau 5**) en effectuant la TOCSY à 300 MHz (**Figure 51**) et l'HMBC à 400 MHz (**Figure 52**).

Tableau 5 : Déplacements chimiques en ppm des NH, H α , H β , H γ , Hb et Hc du dipeptide (–)-**171**.

Aminoacide	NH	H α	H β	H γ	Hb	Hc
1	5,64	2,56-2,73	2,56-2,73	3,45-3,57	1,65-1,87 2,29-2,39	1,65-1,87
2	5,71	3,00-3,07	2,56-2,73	3,18-3,26 3,45-3,57	1,65-1,87 2,29-2,39	1,65-1,87

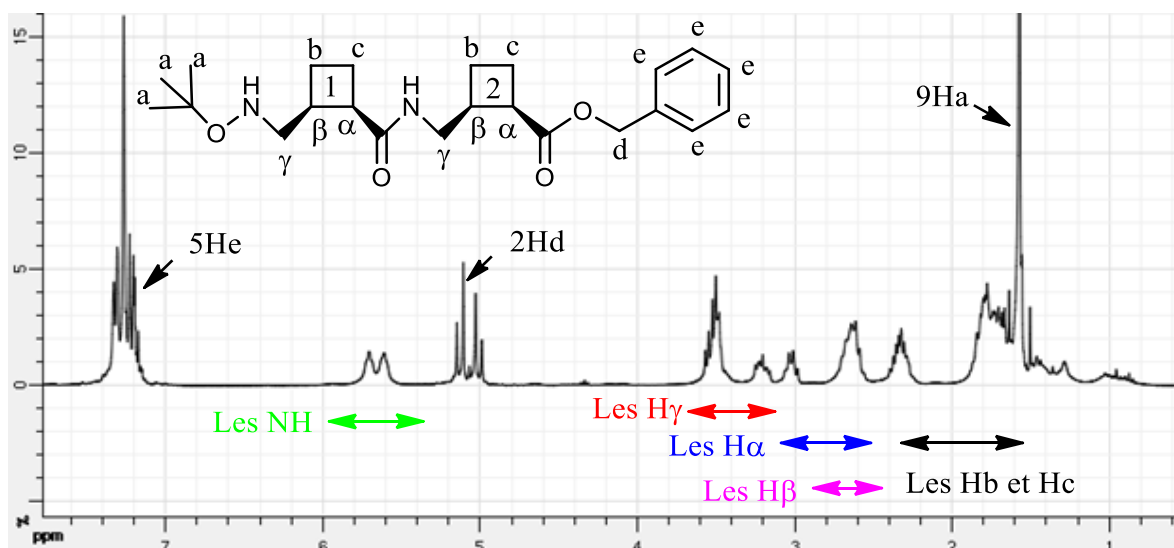


Figure 50 : Spectre RMN ^1H à 400 MHz du dipeptide **(-)-171** dans le C_6D_6 .

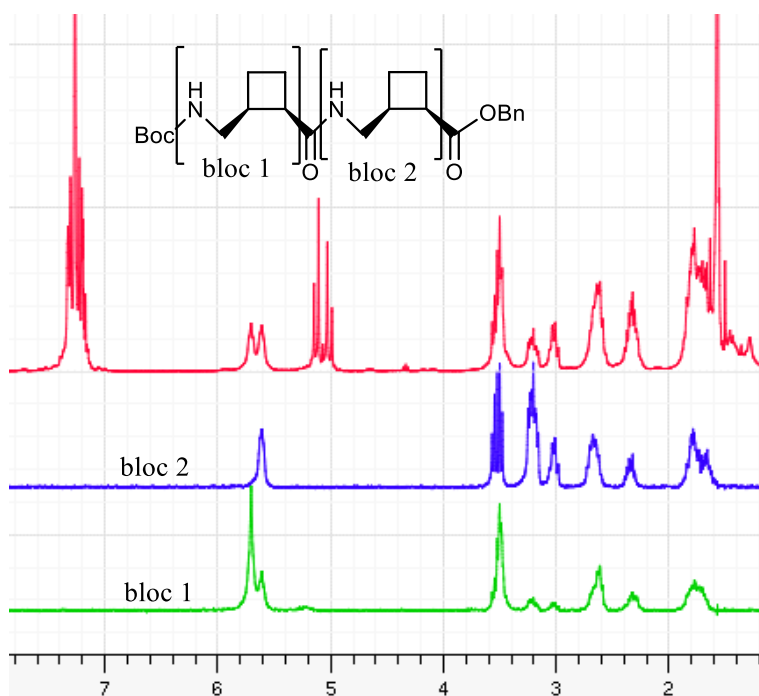


Figure 51 : Spectres TOCSY (en bleu et en vert) à 300 MHz du dipeptide **(-)-171** montrant les couplages scalaires dans chacun des blocs du dipeptide. En rouge, le spectre de ^1H du dipeptide **(-)-171**.

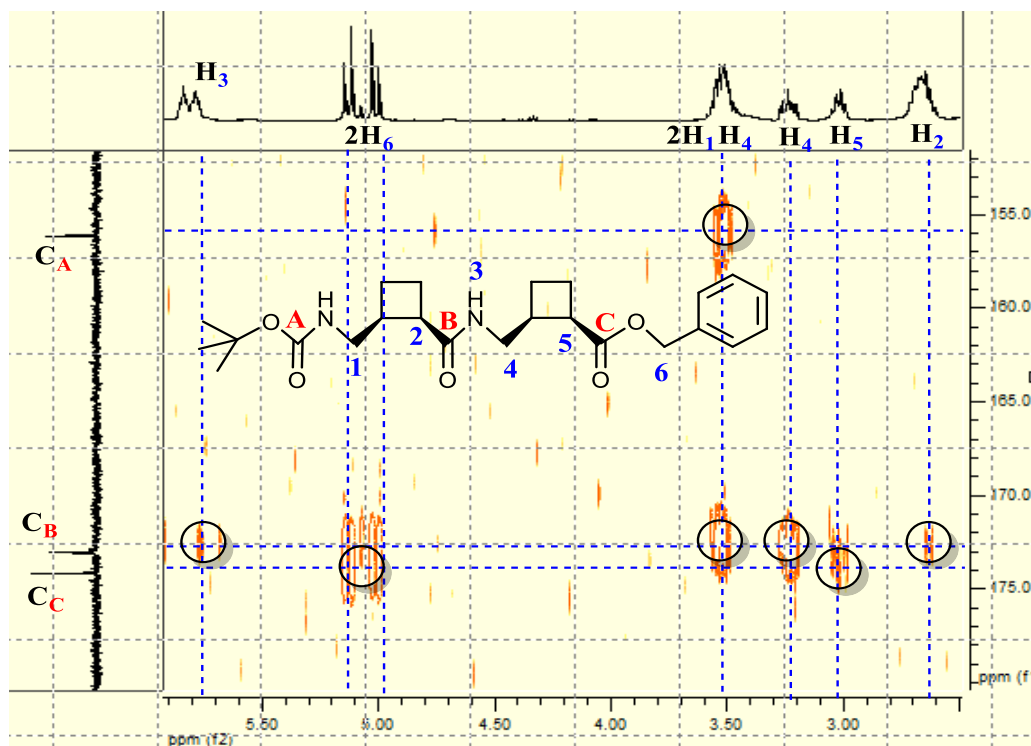


Figure 52 : Spectre HMBC à 400 MHz du dipeptide (–)-**171**.

Nous avons ensuite réalisé une expérience d'échange isotopique avec le méthanol deutéré (CD_3OD), en laissant évoluer le système sur 90 min (**Figure 53**). Un volume de 25 μL de CD_3OD a été introduit dans un tube RMN contenant le dipeptide (–)-**171** (20 mM) dans le C_6D_6 (500 μL). On observe que l'intégration du proton H-2 a diminué de moitié après 30 min, alors qu'il en faut 90 min pour celle de H-1. En plus, une variation de déplacement chimique de 0,110 et de -0,026 ppm est observée pour les protons H-1 et H-2 respectivement. On peut donc en déduire que les deux protons sont facilement échangeables, et ne sont donc pas impliqués dans les liaisons intramoléculaires.

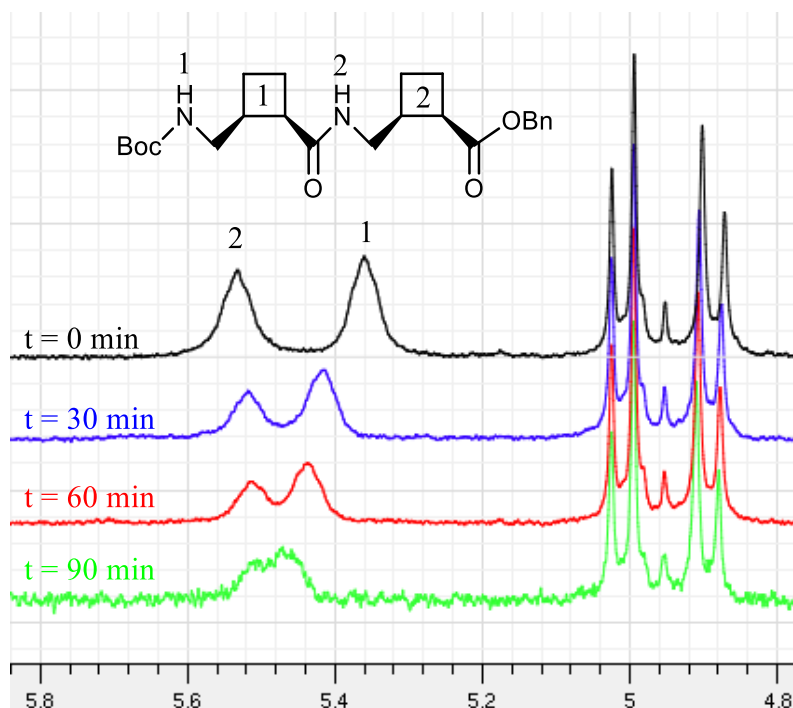


Figure 53 : Variation isotopique des NH du dipeptide (-)-**171** par ajout de CD₃OD.

c- Le tétrapeptide (-)-**178**

La tendance du tétramère à former des gels dans plusieurs solvants organiques ou à être insoluble nous a causé quelques difficultés pour effectuer les études spectroscopiques. En plus, il est nécessaire de se situer dans une gamme de concentration supérieure ou égale à 20 mM, d'après les observations faites au laboratoire, pour que l'analyse ne perde pas en sensibilité. Cependant, pour ces concentrations, on risque de favoriser l'agrégation des molécules entre elles, et ainsi obtenir des spectres RMN ininterprétables. Les meilleures conditions pour effectuer les spectres RMN ¹H et ¹³C du tétrapeptide (-)-**178** ont été dans le CDCl₃, à 300 K, avec une concentration de 20 mM. Bien qu'un début d'agrégation ait été observé dans le tube RMN dans ces conditions, nous avons pu effectuer l'attribution des pics de ¹H et ¹³C. Par contre, l'expérience d'échange isotopique n'a pu être réalisée. Sachant qu'une augmentation de la température empêche la gélification, cela pourrait être une solution pour reprendre plus tard la mesure de l'échange isotopique sur le tétramère.

La **Figure 54** représente le spectre RMN ¹H à 400 MHz du tétrapeptide (-)-**178** dans le CDCl₃ à 20 mM. Dans ce solvant, les NH sont suffisamment séparés, mais les zones des H_α, H_β, et H_γ présentent beaucoup de recouvrements de signaux. Malgré cela nous avons pu attribuer chaque signal (**Tableau 6**).

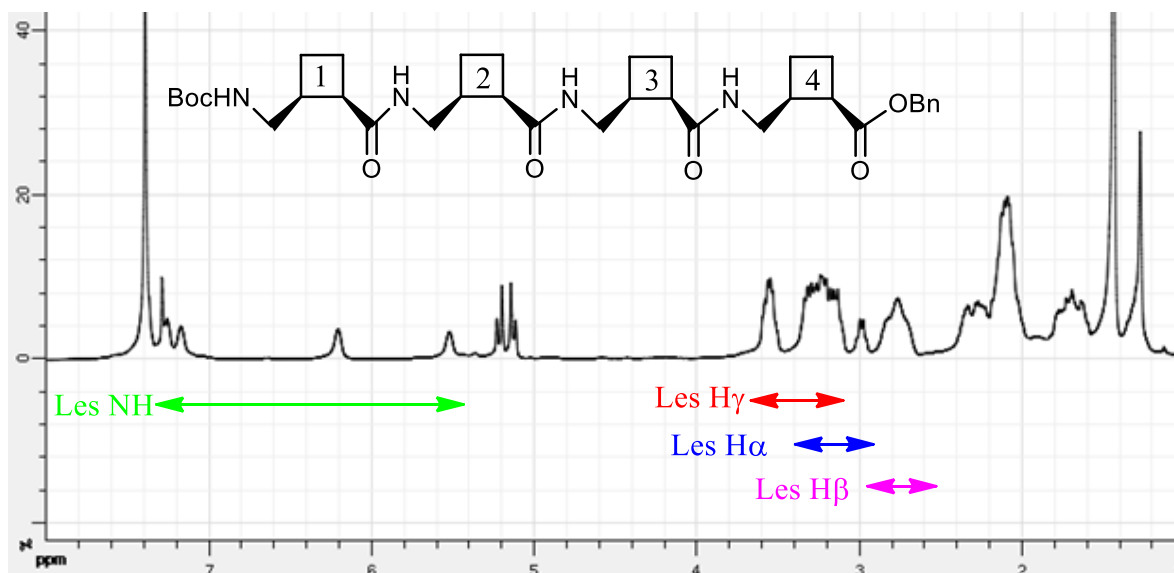


Figure 54 : Spectre de ^1H à 400 MHz du tétrapeptide (–)-**178** dans le CDCl_3 .

Tableau 6 : Déplacements chimiques en ppm des NH, $\text{H}\alpha$, $\text{H}\beta$, et $\text{H}\gamma$ du tétrapeptide (–)-**178**

Aminoacide	NH	$\text{H}\alpha$	$\text{H}\beta$	$\text{H}\gamma$
1	5,50	3,09-3,31	2,61-2,88	3,09-3,31
2	7,24	2,95-3,00	2,61-2,88	3,09-3,31 3,47-3,57
3	5,15	3,09-3,31	2,61-2,88	3,09-3,31 3,47-3,57
4	6,19	3,09-3,31	2,61-2,88	3,09-3,31 3,47-3,57

C- Etude par dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) est une méthode spectroscopique d'absorption de lumière, qui donne des informations sur la structuration des molécules en solution. La lumière qui représente des ondes électromagnétiques peut osciller selon plusieurs orientations, et par suite on dit qu'elle est polarisée. La figure décrite au cours du temps par le champ électrique selon ses composantes vectorielles, peut prendre la forme d'un cercle. Dans ce cas, on parle d'un état de polarisation d'onde circulaire, qui se décompose en la somme d'une polarisation circulaire gauche et d'une polarisation circulaire droite. Un chromophore dans un environnement asymétrique, absorbe différemment ces composantes, puisqu'elles possèdent des coefficients d'extinction molaires (ϵ) différentes. Au fur et à mesure que la lumière avance dans la solution, une variation de son ellipticité (θ) est induite. Cette ellipticité correspond à la différence d'absorbance mesurée pour chaque longueur d'onde. Le CD permet de mesurer l'ellipticité molaire par la formule :

$$\theta = \Delta\epsilon \times C \times l \text{ (deg.cm}^2\text{)}$$

$\Delta\epsilon$ = différence des coefficients d'extinction

C = concentration en mol/L

l = largeur de la cellule en cm

L'ellipticité molaire est convertie en ellipticité par résidu pour pouvoir comparer une série d'oligomères. L'ellipticité par résidu est obtenue par la formule suivante :

$$[\theta] = (100 \times \theta) / C \times l \times n \text{ (deg.cm}^2\text{,dmol}^{-1}\text{)} \quad n = \text{nombre de résidus du peptide}$$

Le plus important groupement chromophore dans un peptide est la fonction amide. La bande d'absorption de celle-ci se situe dans une zone de l'UV-lointain (178-250 nm). Le spectre de CD est enregistré en degré d'ellipticité en fonction de la longueur d'onde.

Le spectre d'une protéine et des α -peptides naturels structurés en hélice présente une bande négative proche de 222 nm, qui ne dépend pas de la longueur de l'hélice, une autre bande négative proche de 208 nm et une bande positive proche de 192 nm. Les intensités de ces deux bandes sont proportionnelles à la longueur de l'hélice. Le spectre d'une protéine structurée en feuillets- β présente lui une bande négative à 216-220 nm, une bande positive à 195-200 nm, et une bande négative proche de 175 nm. Toutefois, la position et l'intensité de ces deux bandes sont variables, ce qui entraîne moins de précision dans la prédiction des structures en feuillets- β que pour les hélices. Une structuration amorphe (random coil) présente une bande à 195 nm.^{135,136,137}

Généralement, les mesures de CD sont réalisées sur des solutions diluées de protéines (0,01-0,2 mg/mL) ce qui minimise les agrégations des molécules. Les solvants choisis pour les expériences dans l'UV sont généralement ceux qui absorbent peu dans cette région spectrale, comme l'acétonitrile et les alcools.

Les structures secondaires des β -peptides ont été aussi étudiées par CD. Aitken et coll.¹³⁰ ont étudié la structuration des oligomères du *trans*-ACBC **181**, **182**, **183** et **184**, par CD à des concentrations de 0,2 mM dans le MeOH. Les spectres obtenus montrent un changement de conformation avec l'augmentation de la chaîne d'oligomère. Une évolution du comportement a été observée en passant du dimère **181** au tetrapeptide **182** et à l'hexamère **183**. Le spectre de l'hexamère et de l'octamère présentaient tous les deux un maximum à 209 nm et un minimum proche de 227 nm (**Figure 55**) Ce qui pourrait laisser penser à une structuration en hélice-12 pour l'hexamère et l'octamère.

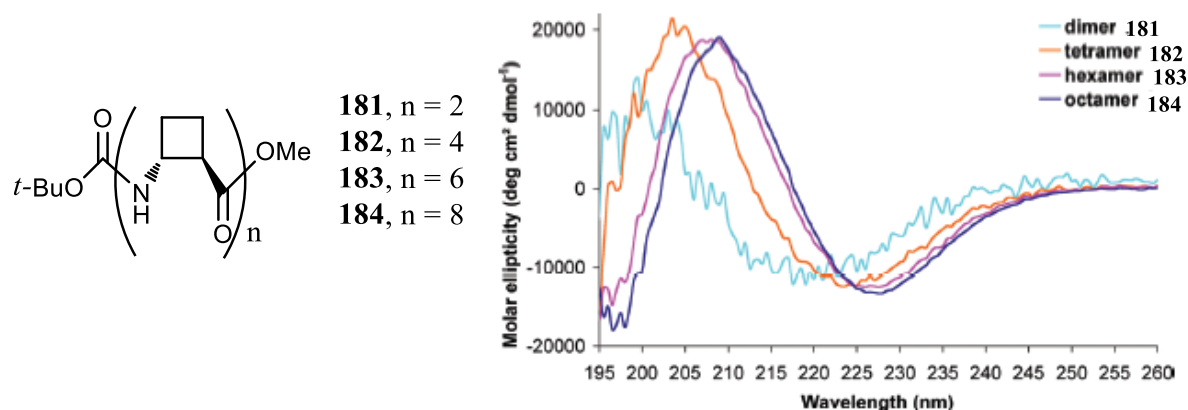


Figure 55 : *trans*- β -peptides cyclobutaniques ; spectre de CD dans le MeOH (0,2 mM) du dimère **181**, tétramère **182**, hexamère **183** et de l'octamère **184**.¹³⁰

Ortuño et coll.¹³⁸ ont étudié la structuration du *cis*- β -peptide cyclobutanique par CD à différentes concentrations (0,2-2,0 mM) dans le MeOH. Ils ont observé une bande négative proche de 200 nm, qu'ils ont attribué à une structuration en feuillet- β . Ortuño et coll.¹³¹ ont aussi étudié la structuration d'oligomères hybrides, formé de l'alternance de l'acide (1*R*,2*S*)-2-aminocyclobutanique avec une glycine (oligomères **185**, **188** et **190**), une β -alanine (oligomères **186** et **191**) ou un GABA (oligomères **187**, **189** et **192**), par CD et par RMN. Le spectre de CD de ces peptides en solution dans le MeOH à 0,5 mM a montré un pic négatif à 217-219 nm pour les α,β -peptide et les β,γ -peptides indiquant une structuration en feuillets- β . Le spectre CD des β,β -peptides montre un pic à 223 nm attribué à une structuration en hélice-14 (**Figure 56**).

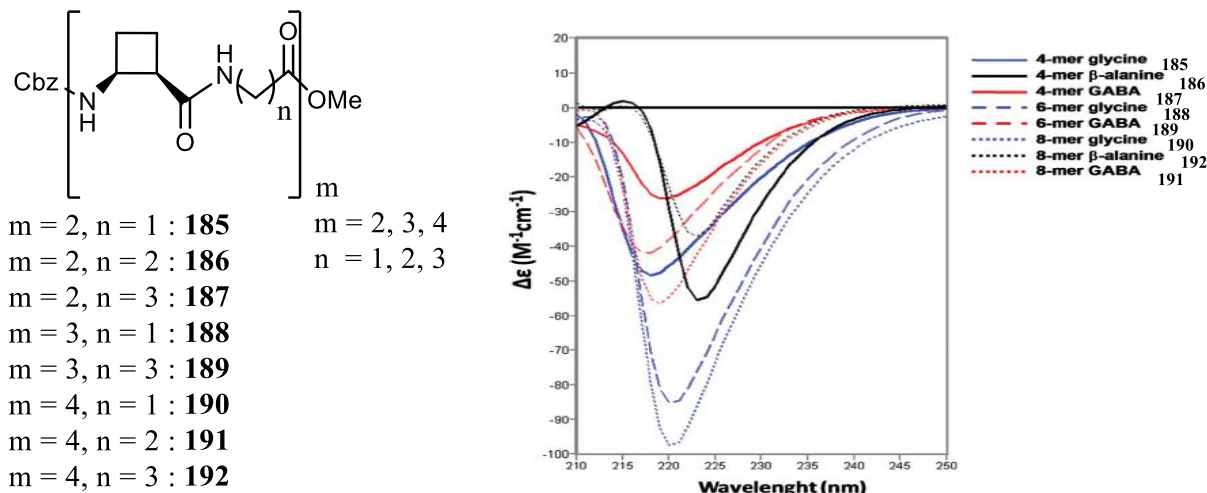


Figure 56 : Hétéropeptides à base d'acides aminés cyclobutaniques ; spectre de CD dans le MeOH (0,5 mM) de ces oligomères.¹³¹

Dans une autre étude,¹³⁹ les xérogels (le xérogel est le solide restant de l'évaporation du solvant d'un gel) des oligomères **185**, **186**, **187** et **193** initialement gélifiés dans le toluène ont été préparés. Le spectre de CD à l'état solide des xérogels de ces oligomères, à 30 mM dans le KBr, a donné des spectres d'allures différentes de celui fait en solution. Les spectres présentent tous un pic négatif à 224-226 nm et un pic positif à 242-251 nm (**Figure 57**). Les auteurs en ont déduit que les molécules formaient des structures en hélice dans les agrégats supramoléculaires.

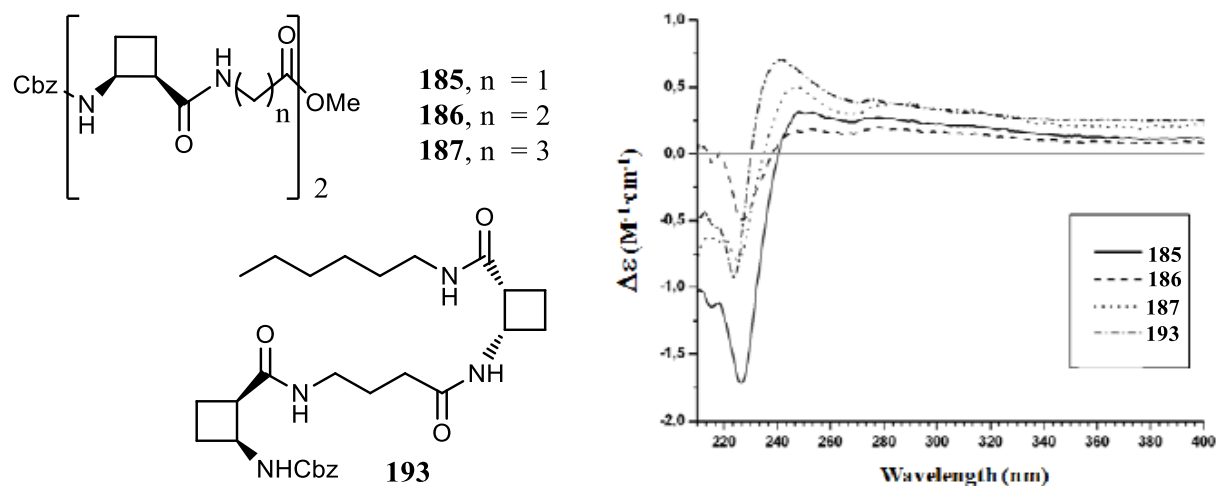


Figure 57 : β -peptides cyclobutaniques (gauche) ; spectre de CD à l'état solide (30 mM dans le KBr) des térapeptides **185**, **186**, **187** et **193**.¹³⁹

Aucune étude par dichroïsme circulaire n'a été publiée dans la littérature à ce jour sur des homo-oligomères de γ -aminoacides. Nous avons effectué une étude par CD sur le dipeptide (–)-**171**, le tripeptide (–)-**173** et le tetrapeptide (–)-**178** en solution à 0.2 mM dans l'acétonitrile à une température fixée à 20 °C. L'acétonitrile a été choisi car il est apparu comme un bon solvant pour les peptides (–)-**171** et (–)-**173** et ne présentait pas de bande d'absorption dans l'intervalle de longueur d'onde étudié. Par contre, le tetrapeptide (–)-**178** était faiblement soluble dans ce solvant. Le dimère (–)-**171** a présenté une bande positive très faible à 202-212 nm. La courbe du tripeptide (–)-**173** présente une toute autre allure. En effet on observe une bande négative à 203-207 nm. Cette bande négative a été observée dans le spectre CD de l'heptapeptide en feuillet construit à partir du *cis*-ACPC (ACPC = acide *cis*-2-aminocyclopentanique).¹³⁶ Le tetramère (–)-**178** présente le même comportement avec une bande d'absorption plus faible déplacée vers la droite. Ainsi, le tetramère (–)-**178** possède une bande négative à 212 nm (**Figure 58**).

D'après cela, ces peptides ne possèdent pas une ellipticité, et donc aucune structuration en hélice n'est observée. Le problème de solubilité du tetrapeptide pourrait induire cette diminution dans sa bande d'absorption.

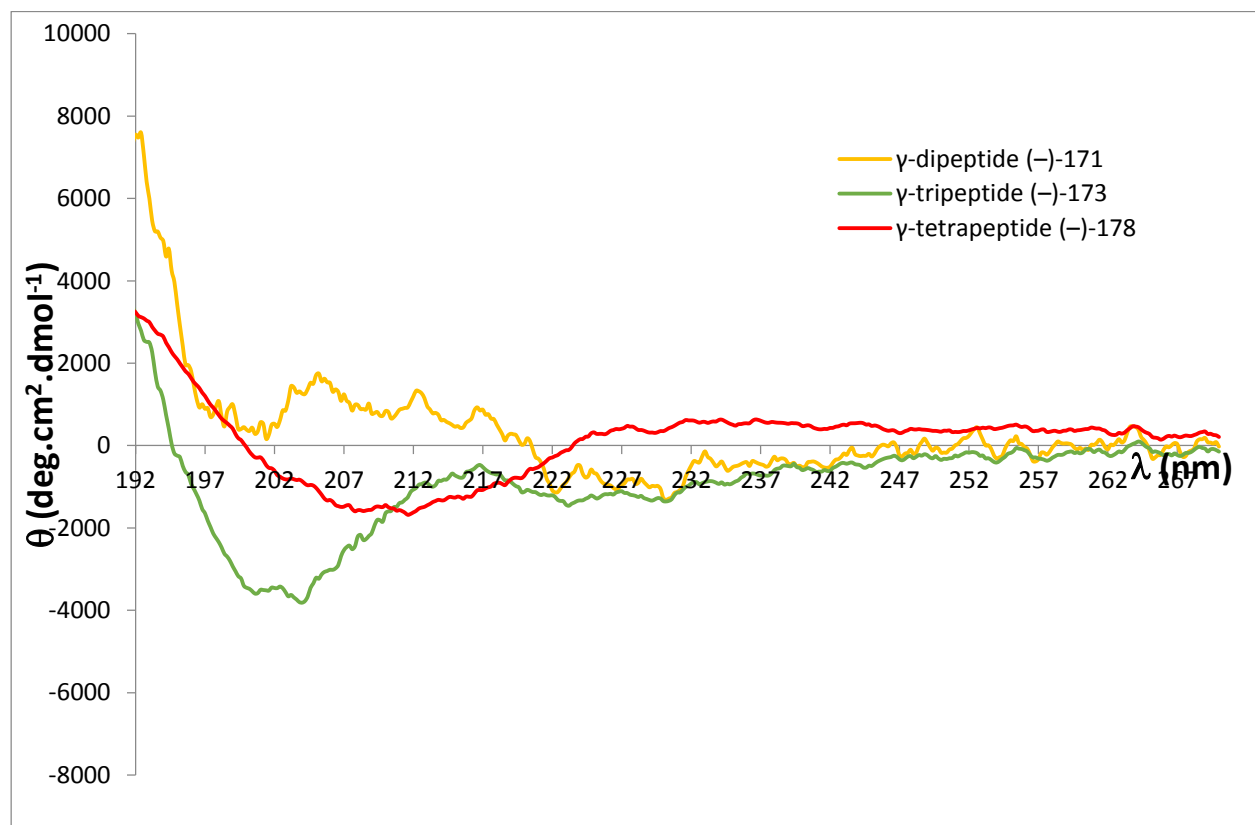


Figure 58 : Spectre de CD des peptides (–)-**171**, (–)-**173** et (–)-**178** (0,2 mM dans l'acétonitrile).

D- Etude par IR

L'infrarouge est une autre technique d'analyse qui peut donner des informations sur la structuration des peptides et des protéines. A la rencontre du faisceau IR, les molécules commencent à vibrer. Il existe deux modes de vibration des molécules : élongation (vibration de valence ou stretching) et déformation. Chaque groupement fonctionnel de la molécule possède des fréquences caractéristiques d'élongation et de déformation. Il existe plusieurs méthodes pour caractériser les échantillons par spectroscopie IR par l'emploi d'accessoires spécifiques :

- 1- *Procédé par transmission (absorption)* : lorsqu'un faisceau de lumière IR passe à travers l'échantillon en solution, la quantité d'énergie absorbée à chaque longueur d'onde par les molécules est mesurée. Ainsi, un spectre de transmission (T) ou d'absorption (A) est établi.
- 2- *Procédé par Réflexion Totale Atténuée (ATR)* : Le faisceau de lumière IR traverse un cristal et subit une réflexion totale à l'interface cristal-échantillon puis est dirigée vers le détecteur. Cependant une onde de lumière, dite évanescente, pénètre l'échantillon de quelques micromètres et peut être absorbée, l'énergie de la réflexion totale est alors atténuée. Cette technique est surtout utilisée pour les échantillons très absorbants. Ce type de mesure se fait sur les composés purs solides ou liquides.

D'après les études théoriques et les observations expérimentales, les bandes I d'élongation des carbonyles des amides montrent une bande forte à $1612-1640\text{ cm}^{-1}$ et une faible bande à $1670-1690\text{ cm}^{-1}$ pour exprimer une structuration en feuillets- β . Par comparaison avec les structurations amorphe (random coil) ou en hélice, les bandes correspondantes aux feuillets- β possèdent des fréquences plus basses. Les bandes intenses et fines à $1610-1620\text{ cm}^{-1}$ correspondent à une structuration antiparallèle (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Principales fréquences caractéristiques des C=O (bande I) des structures secondaires des protéines en cm^{-1} .

Conformation	Feuillet- β antiparallèle	Feuillet- β parallèle	Amorphe	Hélice- α	Coude
C=O (I)	1610-1620 (forte) 1670-1690 (faible)	1626-1640	1640-1651	1650-1657	1655-1675 1680-1696

De même, les bandes II de déformation des carbonyles des amides chez les peptides ayant une structure en feuillets- β antiparallèles sont à 1510-1530 cm^{-1} , alors que les feuillets- β parallèles possèdent des bandes à plus fortes fréquences (1530-1550 cm^{-1}).^{137,140}

Les bandes d'élongation des N-H libres des amides chez les peptides sont des bandes fines à 3446-3456 cm^{-1} , alors que celles des N-H liés sont des bandes larges à 3285-3344.¹³⁵

Les régions des N-H et des C=O ont été examinées par IR dans ces deux modes (transmission et réflexion). Les spectres IR et ATR ont été effectués sur les dipeptides, (-)-**170** et (-)-**171**, le tripeptide (-)-**173**, et sur le tétrapeptide (-)-**178**. Les spectres IR des dipeptides (-)-**170**, (-)-**171** et du tétrapeptide (-)-**173** ont été effectués sur des solutions de 20 mM dans le chloroforme. Cette concentration a été choisie afin d'éviter la formation d'agrégats

Le spectre IR du dipeptide (-)-**170** a montré une bande fine N-H à 3444 cm^{-1} et trois bandes pour le de C=O à 1707, 1659 et à 1506 cm^{-1} (**Figure 59**).

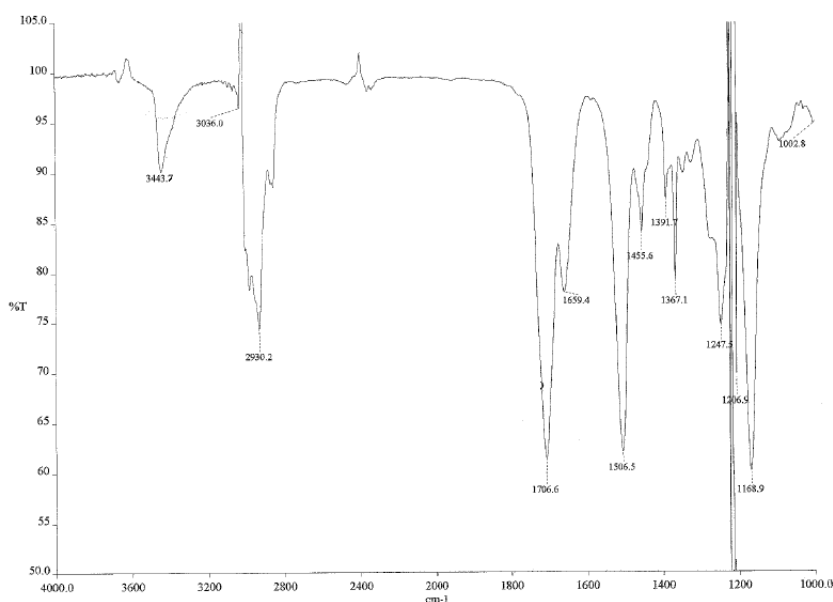


Figure 59 : Spectre IR du dipeptide (-)-**170** en solution dans CHCl_3 .

Le spectre IR du dipeptide (-)-**171** possède les mêmes fréquences de N-H et C=O, une bande à 3449 cm^{-1} , deux bandes d'élongation à 1708 et 1657 cm^{-1} , et une bande de déformation à 1507 cm^{-1} (**Figure 60**).

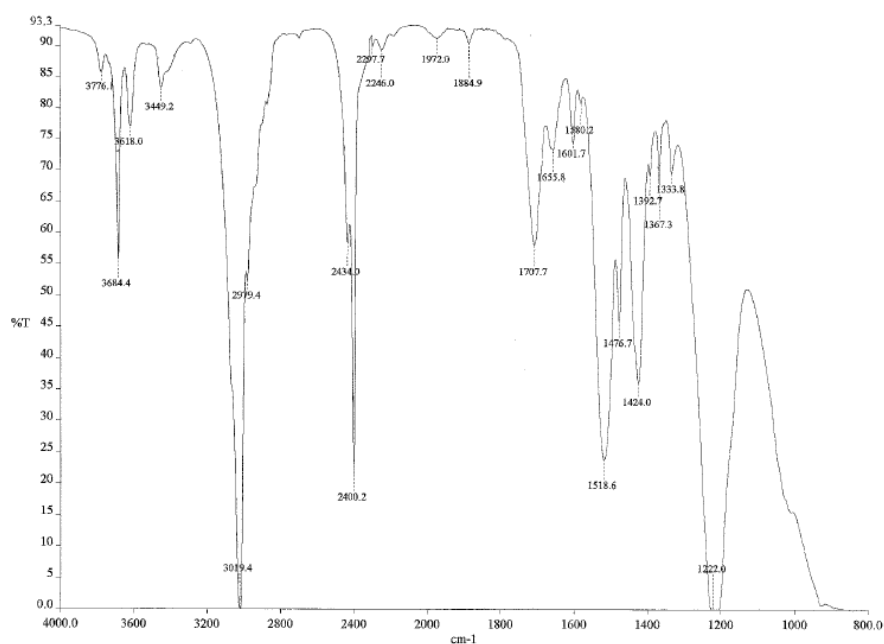


Figure 60 : Spectre IR du dipeptide (–)-**171** en solution dans CHCl_3 .

Cependant, le spectre ATR montre une bande de N–H à 3316 cm^{-1} et trois bandes C=O à 1727 , 1687 et 1649 cm^{-1} .

Nous avons effectué un spectre ATR sur le tripeptide (–)-**173** et le spectre a montré une bande N–H à 3319 cm^{-1} ainsi que trois bandes de C=O à 1725 , 1686 et 1644 cm^{-1} .

Le spectre IR du térapeptide (–)-**178** présente une large bande des N–H montrant deux pics à 3362 et à 3443 cm^{-1} ainsi que deux larges bandes d'élongation de C=O à 1648 et 1708 cm^{-1} et une bande de déformation à 1511 cm^{-1} (**Figure 61**).

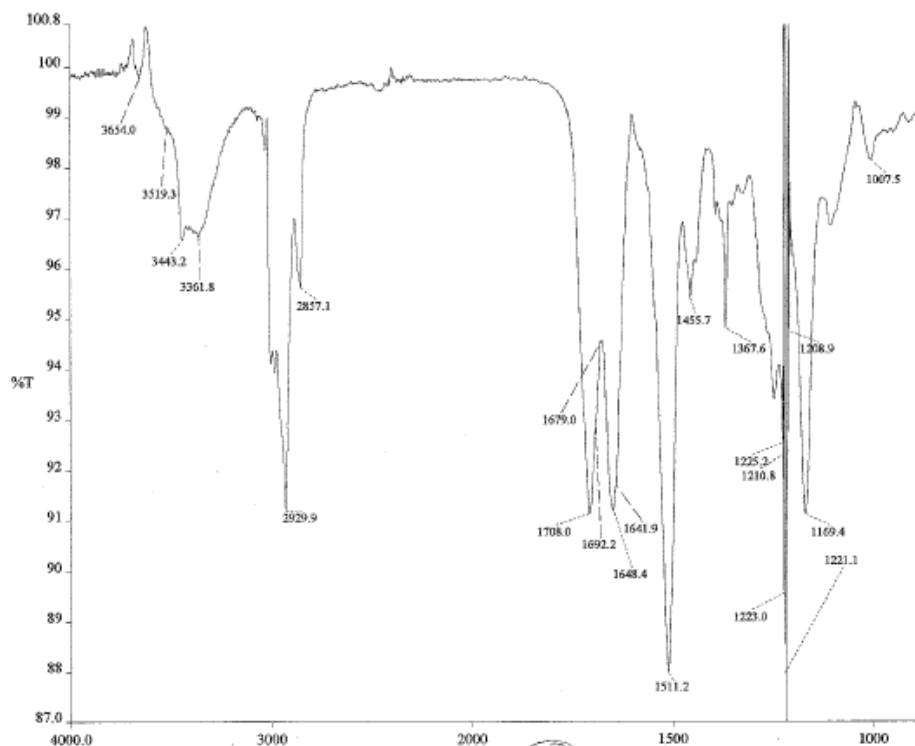


Figure 61 : Spectre IR du tétrapeptide (–)-**178** en solution dans CHCl₃.

Le spectre ATR du tétrapeptide (–)-**178** montre deux bandes de N–H à 3319 et 3361 cm^{–1}, et quatre bandes C=O à 1628, 1644, 1686 et 1725 cm^{–1}.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Bandes des N–H et C=O des spectres IR en solution ou solide (ATR) des dipeptides (–)-**177** et (–)-**178**, du tripeptide (–)-**173** et du tétrapeptide (–)-**178** en cm^{–1}.

Composé		Dipeptide (–)-170	Dipeptide (–)-171	Tripeptide (–)-173	Tétrapeptide (–)-178
N–H	Solution	3444	3449	–	3362 3443
	ATR	–	3316	3319	3319 3361
C=O	Solution	1506 1659 1707	1507 1657 1708	–	1511 1648 1708
	ATR	–	1649 1687 1727	1644 1686 1725	1628 1644 1686 1725

D'après ces résultats, les N–H obtenus dans les dipeptides (–)-**170** et (–)-**171** sont tous libres en solution. Alors que pour le térapeptide, (–)-**178** nous avons observé des N–H liés (3362 cm^{-1}) ainsi que libres (3443 cm^{-1}), ce qui pourrait se traduire par un début d'assemblage intermoléculaire dans le chloroforme. Cependant, les bandes des N–H obtenues par mode ATR montrent que les N–H sont tous liés. En effet, en passant de l'IR en solution vers l'ATR (solide), les bandes d'élongation des N–H et des C=O sont déplacées vers les plus basses nombres d'ondes et leurs intensités augmentent. Cela est dû à la formation des agrégats.¹³⁹

Au cours des analyses structurales des différents oligomères, nous avons observé un phénomène de gélification du tripeptide et du térapeptide dans certains solvants (chloroforme, dichlorométhane, acétate d'éthyle, toluène). Cette propriété nous est apparue très intéressante car les gels peuvent avoir de nombreuses applications. Nous avons donc effectué une étude sur la possibilité de gélification des peptides (–)-**171**, (–)-**173** et (–)-**178** que nous avons préparé aussi que sur leurs acides correspondants.

VII- Les Gels

A- Définition et types de gels :

Les gels se trouvent partout. Dans la nature, les gels se trouvent dans le protoplasme,¹⁴¹ ou sous forme de collagène constituant la matrice extracellulaire (ECM), le cartilage, les os, les vaisseaux sanguins, les tissus fœtaux, la cornée, la gaine de myéline.¹⁴² L'agar-agar, l'agarose et la carraghénane extraits à partir des algues, et pectine (substance d'origine végétale)¹⁴³ constituent des exemples de gels naturels (**Figure 62**).

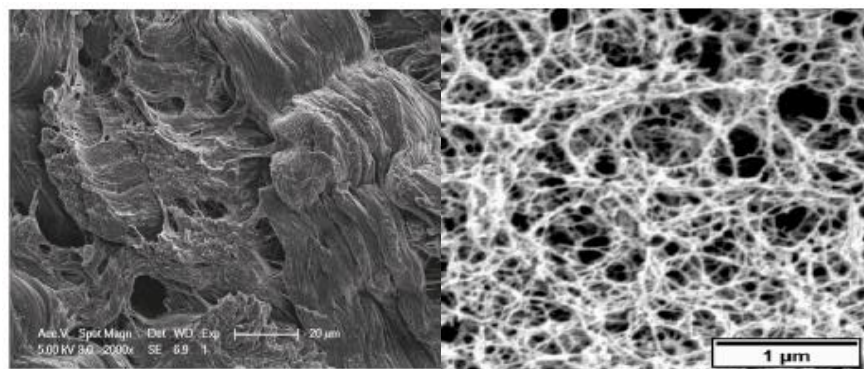


Figure 62 : Images par SEM du collagène (gauche) et de l'Agarose (droite).^{144,145}

Il existe beaucoup de définitions des gels appuyées sur des observations macroscopiques qualitatives ou sur les propriétés microscopiques et macroscopiques en même temps, parmi

lesquelles la définition succincte de Dorothy Jordan Lloyd : s'il a l'allure d'un gel, c'est qu'il est un gel.¹⁴⁶ Un gel est formé de : un/plusieurs solvants maintenus à une température définie, et un/plusieurs solides qui constituent le gélifiant. D'après Jordan Lloyd, un gel possède les propriétés mécaniques d'un solide, dans le sens où il peut conserver sa propre forme et supporter son propre poids par un simple test d'inversion. L'apparence solide du gel est due à l'immobilisation des molécules du solvant dans un réseau tridimensionnel formé par les molécules du gélifiant. Selon la nature des interactions entre les molécules du gélifiant, les chimistes différencient **les gels chimiques** dus aux liaisons covalentes qui forment ce réseau tridimensionnel, et **les gels physiques** ou **supramoléculaires** dus au phénomène d'auto-assemblage du gélifiant qui crée ces réticulations. Ces gels peuvent être constamment formés (état gel) et brisés (état sol ou solution) sous l'influence de facteurs environnementaux externes.^{147,146,148}

B- Formation d'un gel et ses applications

La gélification ou transformation d'une solution en gel (transformation sol-gel) est effectuée par la solubilisation d'une faible quantité de gélifiant (généralement 0,1-10 wt %, de façon à dépasser la **Concentration Minimale de Gélification (MGC)** dans un solvant, par chauffage et/ou sonification, suivi d'un refroidissement en-dessous de la température critique de gélification (T_{gel}). Les gels formés à partir des gélifiants à basses masses molaires (**LMWG = Low Molecular-Weight Gelator**) font partir des gels supramoléculaires, qui en général, sont des gels thermoréversibles (la transformation sol-gel est réversible après chauffage et refroidissement). Ils peuvent s'auto-assembler grâce aux interactions non-covalentes comme les liaisons-hydrogène, les interactions π - π , les forces de Van der Waals. Les **LMWG** reçoivent depuis récemment un grand intérêt.¹⁴⁷ Selon la nature du solvant, organique ou aqueux, les gels sont classés en **organogels** ou **hydrogels** respectivement.

Pareillement aux oligopeptides et aux protéines naturelles, les gels se composent de structures primaires, secondaires et tertiaires (**Figure 63**). La structure primaire (de l'angström vers le nanomètre) est déterminée par le phénomène d'auto-assemblage des LMWGs qui est responsable de la formation des agrégats ou du système de fibrilles. Pour réaliser la gélification, il doit y avoir un équilibre entre la tendance des LMWGs à se dissoudre et leur tendance à s'agréger. La structure secondaire (du nano- vers le micromètre), est définie par la forme de l'agrégat (les micelles, les vésicules, les fibres et les feuilletts), qui lui-même dépend de la structure moléculaire. Finalement, la structure tertiaire d'un gel (du micro- vers le millimètre) comprend les interactions entre les agrégats, et détermine si ces agrégats ont piégés le solvant pour former un gel, ou si au contraire ils

ont précipité dans le milieu sous forme de micelles, vésicules, lamelles, ou des précipités amorphes ou cristallins. L'évolution d'une structuration secondaire en une tertiaire dépend du type d'interaction entre les fibres (ou autre agrégat). Les fibres ramifiées enchevêtrées peuvent ainsi former un gel.¹⁴⁹

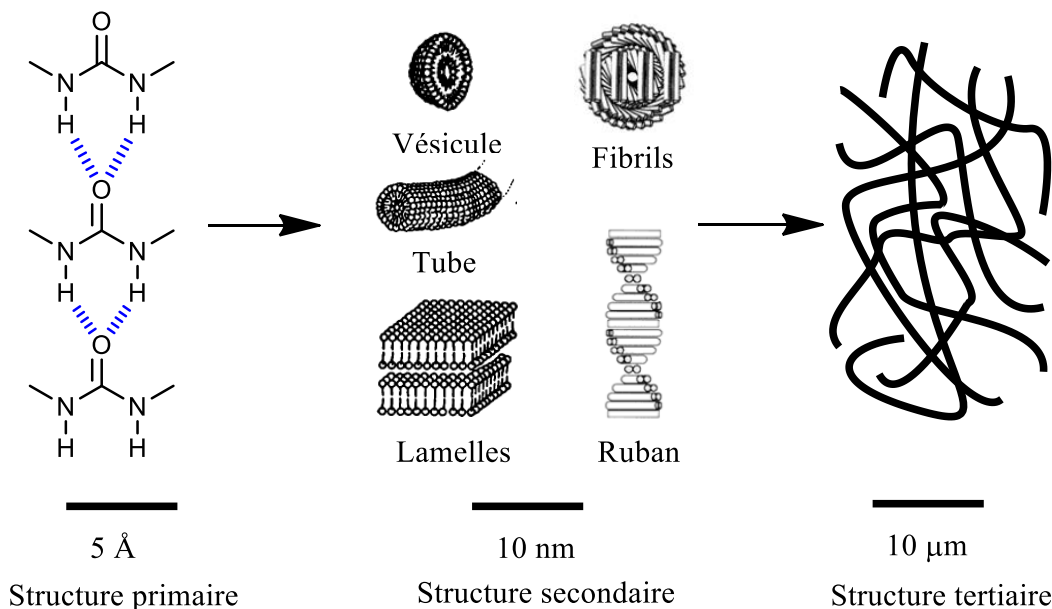


Figure 63 : Les structurations primaires, secondaires et tertiaires d'un gel macroscopique auto-assemblé.¹⁴⁹

Les gels auto-assemblés ou supramoléculaires sont utilisés dans le domaine des biomatériaux en raison de leur structuration en réseaux de nano-fibres qui est de la même grandeur que celui trouvé dans la matrice extracellulaire, fournissant ainsi un pseudo environnement *in vivo* pour l'organisation, la croissance et la différenciation des cellules.¹⁵⁰ Les gels trouvent des applications dans la chimie médicinale,¹⁵¹ la catalyse asymétrique,¹⁵² la science des matériaux¹⁵³ et beaucoup d'autres domaines.¹⁵⁴

a- Application en chimie médicinale et médecine régénérative

Afin de comprendre le comportement de l'ECM, les chimistes cherchent à synthétiser des systèmes supramoléculaires artificiels imitant ce milieu, à partir de peptides, peptidomimétiques ou de dérivés peptidiques pouvant former des réseaux de fibres qui gélifient. Zhang et coll. ont préparé un peptide de 16 résidus [(Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys)₂] (EAK16) se structurant en feuillets-β dans l'eau et qui s'auto-assemble spontanément en une membrane macroscopique fibrilleuse stable dès l'ajout d'une solution saline tamponnée au phosphate (**Figure 64**). Cette membrane possède des ressemblances avec les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques

amyloïdes impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Ce phénomène d'auto-assemblage pourrait servir de système modèle pour étudier l'accumulation des peptides insolubles dans certaines maladies neurologiques.¹⁵⁵

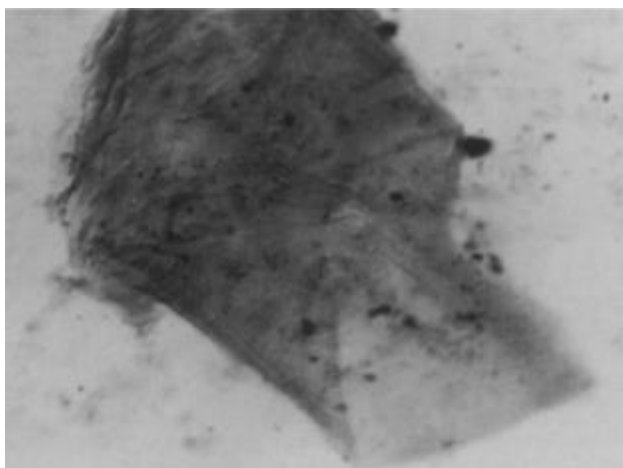
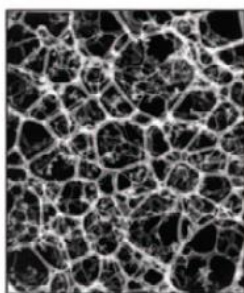


Figure 64 : Image par microscopie à contraste de phase : structure membranaire formée à partir de l'EAK16.¹⁵⁵

Le RAD16 est une famille de peptides qui s'auto-assemblent et gélifie sous forme de fibres de feuillet- β (**Figure 65**). Le RAD16-I particulièrement, commercialisé sous le nom de PuraMatrix[®] est utilisé fréquemment comme milieu de culture de cellules dans les laboratoires, à cause de son réseau de nano-fibres et ses propriétés biomécaniques qui ressemblent à l'ECM.¹⁵⁶



RAD16-I : AcNH-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-COONH₂

Figure 65 : Image par microscopie électronique de 2,4 mg/mL du RAD16-I (en haut) ; séquence d'acides aminés du RAD16-I (en bas).¹⁵⁶

Les peptides auto-assemblés peuvent jouer un rôle biologique important dans la vectorisation des protéines à travers le corps.¹⁵⁷ Le RAD16-II (faisant partie de la famille des RAD16) associé à la

biotine (ou vitamine B₈, nécessaire à la croissance cellulaire), a permis la délivrance graduelle d'un facteur de croissance (l'IGF-1 complexé avec la Streptavine) dans le cœur des rats durant 28 jours.¹⁵⁸

Xu et coll.¹⁵⁹ ont développé un hydrogel pouvant traiter les blessures dues à une contamination par l'uranium. Cet hydrogel multifonctionnel est formé par trois composants : deux aminoacides (Fmoc-L-Leucine et Fmoc-L-Lysine) qui réduisent l'inflammation, et un bisphosphonate qui se coordonne aux ions UO²⁺ et réduit leur toxicité. Le traitement des blessures cutanées chez les souris par administration de l'hydrogel, a conduit à leur rétablissement. L'état des souris non traitées s'était lui dégradé, pouvant aller jusqu'à la mort.

b- Application en catalyse

Inoue et coll.¹⁶⁰ ont été les premiers à publier l'utilisation d'un gel supramoléculaire comme organo-catalyseur. Ils ont effectué l'addition de cyanure d'hydrogène sur le *m*-phenoxybenzaldéhyde en présence d'un cyclodipeptide (cyclo[(*S*)-Phe-(*S*)-His]) **194** (Schéma 81 : Réaction catalysée par un cyclopeptide.). Ils ont observé que l'utilisation du toluène comme solvant couplé avec une température < 0 °C entraînait l'apparition d'un gel dans le milieu réactionnel. Dans ces conditions les ee étaient supérieures à ceux observés en milieu homogène. La basse température et la formation d'un gel sont accompagnées d'une augmentation de la stéréosélectivité.

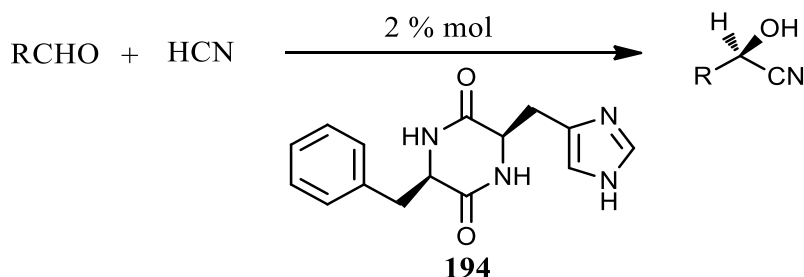


Schéma 81 : Réaction catalysée par un cyclopeptide.

Récemment, Guler et Stupp¹⁶¹ ont utilisé des peptides synthétiques contenant le groupement imidazole comme catalyseurs de la réaction d'hydrolyse du 2,4-dinitrophényl acétate (DNPA). L'utilisation des groupements imidazoles dans des catalyses artificielles est très populaire, vue la présence d'histidine dans les sites catalytiques de plusieurs enzymes qui effectuent la réaction d'hydrolyse. Ces peptides forment différentes structures bien déterminées, qui influent directement sur l'efficacité de l'hydrolyse. Un peptide **195** pouvant s'auto-assembler en nano-fibres et former un gel (**Figure 66**) a montré la plus grande vitesse d'hydrolyse par rapport aux peptides qui forment

des agrégats sphériques. La haute densité des sites actifs présents à la surface des catalyseurs supramoléculaires ayant des structures internes ordonnées (nano-fibres) rend l'hydrolyse des esters plus efficaces.

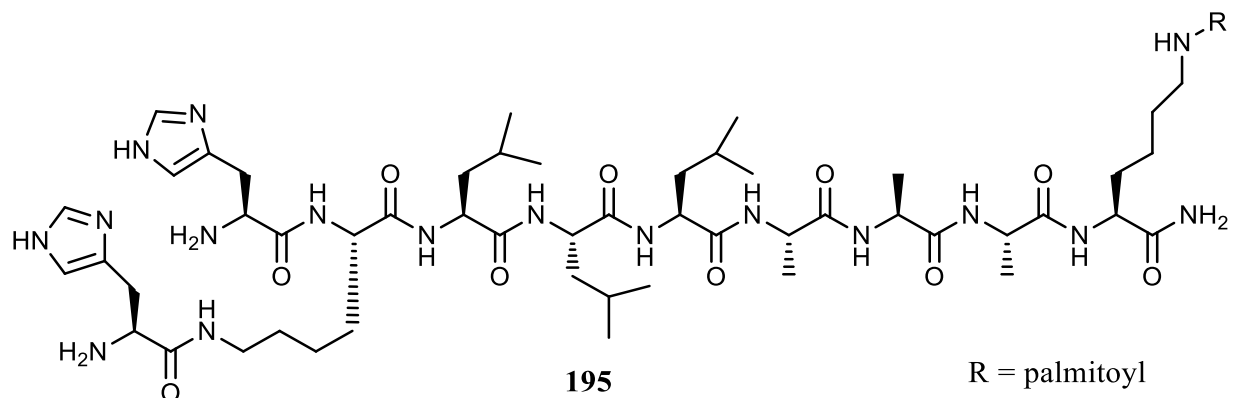


Figure 66 : Peptide catalyseur de l'hydrolyse du DNPA.

C- LMWGs peptidomimétiques

a- Les α - et les β -aminoacides dans les LMWG

Tomasini¹⁶² a préparé les pseudo-peptides **196** et **197** en couplant le *L*-Phe-*D*-Oxd (Oxd = 4-carboxy-5-méthylloxazolidin-2-one) avec l'acide azélaïque (diacide carboxylique à longue chaîne) (**Figure 67**). Ces deux composés ont montré une propension à la gélification dans les mélanges H₂O/EtOH. Ils ont ensuite été testés quant à leur biocompatibilité vis-à-vis de cellules IGROV-1 (cellules cancéreuses de l'ovaire). L'hydrogel du pseudo-peptide **196** a été absorbé par les cellules sans aucune conséquence sur leur croissance, alors que l'hydrogel de **197** s'est montré cytotoxique. Ce type d'hydrogel pourrait être envisagé pour la vectorisation des molécules thérapeutiques.

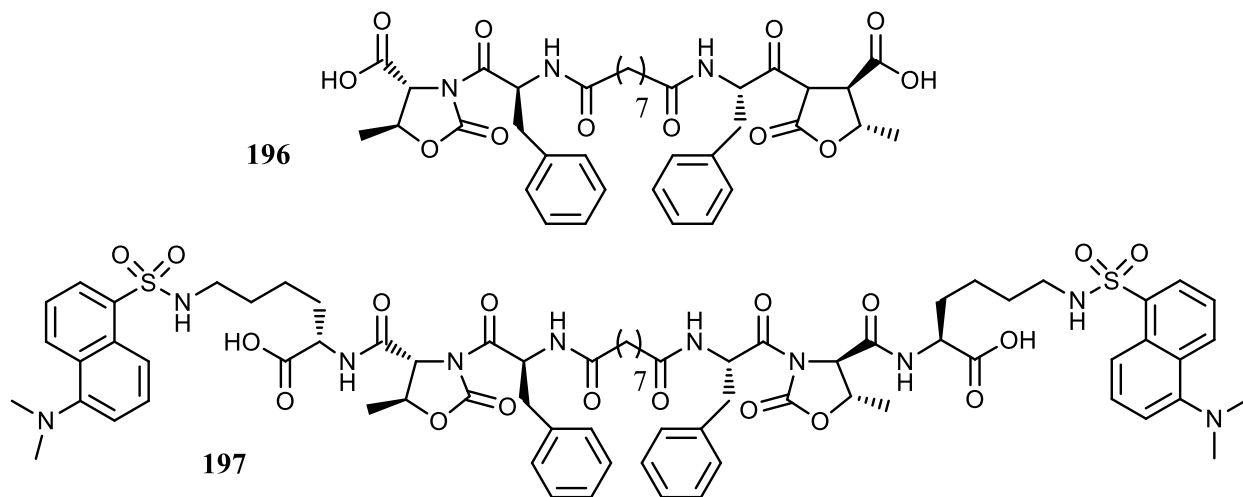


Figure 67 : Pseudo-peptides **196** et **197**.

Banerjee et coll.¹⁶³ ont synthétisé un peptide à base de stilbène connue pour être photosensible. Au cours de l'étude du processus d'auto-assemblage et de gélification, ce peptide a formé un organogel photosensible dans divers solvants organiques. Ils ont trouvé aussi que la morphologie du xérogel de ce peptide (**Figure 68**) dépend de la nature du solvant.

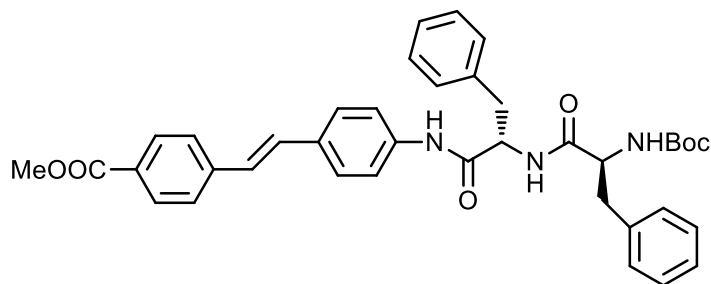


Figure 68 : Structure chimique de l'organogel.

Les images en microscopie électronique à balayage (**MEB**) montrent que les organogels obtenus à partir de l'octanol se structurent en nano-fibres droites, ayant une largeur entre 30-40 nm. Alors que les organogels obtenus à partir du toluène s'arrangent en nano-fibres torsadées, ayant une largeur entre 35-55 nm (**Figure 69**).

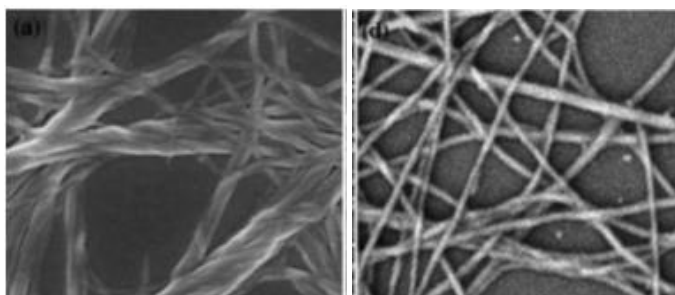


Figure 69 : Images de MEB de l'organogel dans le toluène (a) et dans le *n*-octanol (b).¹⁶³

D'autre part, Banerjee et coll. ont montré que l'organogel dans le *n*-octanol était photosensible à la lumière UV. Les images MEB du xérogel obtenu dans l'octanol et irradié 1 h à 365 nm ont montré la disparition de la structuration en réseau, et la présence de nano-fibres isolées avec des « nano-points » dans le milieu. Après 2 h d'irradiation, toutes les nano-fibres ont disparus, et seuls restent les nano-points. La solution ainsi obtenue ne forme plus de gel même après 2 mois (**Figure 70**). Ce phénomène s'explique par une isomérisation de la partie *trans*-stilbène en *cis*-stilbène lors de l'irradiation sous UV. Cette photoréactivité pourrait trouver des applications dans divers matériaux avancés.

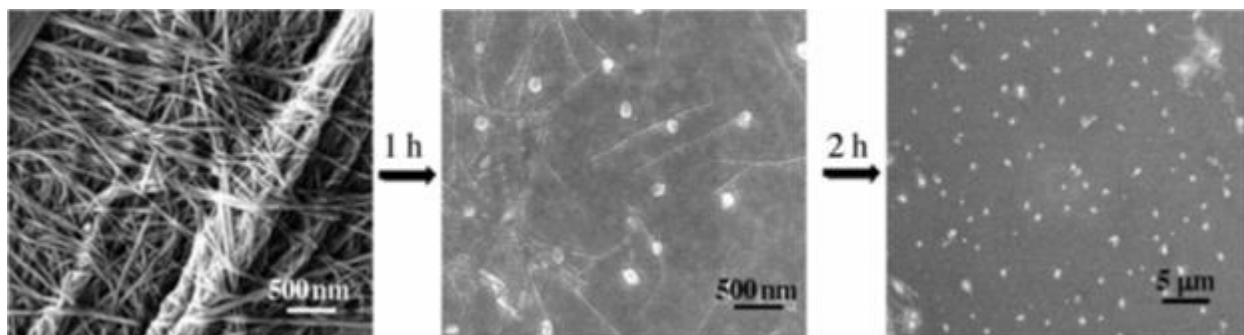


Figure 70 : Images MEB de l'évolution de l'organogel sous irradiation UV.¹⁶³

Fülöp et coll.¹⁶⁴ ont montré que la morphologie d'un gel est directement liée à la structure exacte de l'acide aminé. Pour cela, il a étudié le phénomène d'auto-assemblage de deux homo-oligomères de β -aminoacides cycliques : le *cis*-(1*R*,2*S*)-ACPC_n **198** (ACPC = acide *cis*-2-aminocyclopentanique) et le *trans*-(1*S*,2*S*)-ACHC_m **199** (ACHC = acide *trans*-2-aminocyclohexanique). Ces deux oligomères peuvent en solution se structurer en feuillets et en hélices respectivement. Les images MET des oligomères à 1 mM après incubation dans le méthanol ou l'eau pendant une semaine, montrent que les oligomères de l'ACPC qui se structurent en feuillets ont pu s'auto-assembler en fibrilles (**Figure 71a**). Alors que les oligomères qui se structuraient en hélices forment des vésicules sphériques (**Figure 71b**). Afin de tester le caractère dépendant du temps des structures supramoléculaires, l'expérience de diffusion dynamique de la lumière (DLS) a été effectuée pour chaque oligomère à divers temps. Ils ont pu déduire que le diamètre des fibres a augmenté avec le temps, et que la vitesse de formation des vésicules augmente avec l'augmentation de la taille de l'oligomère.

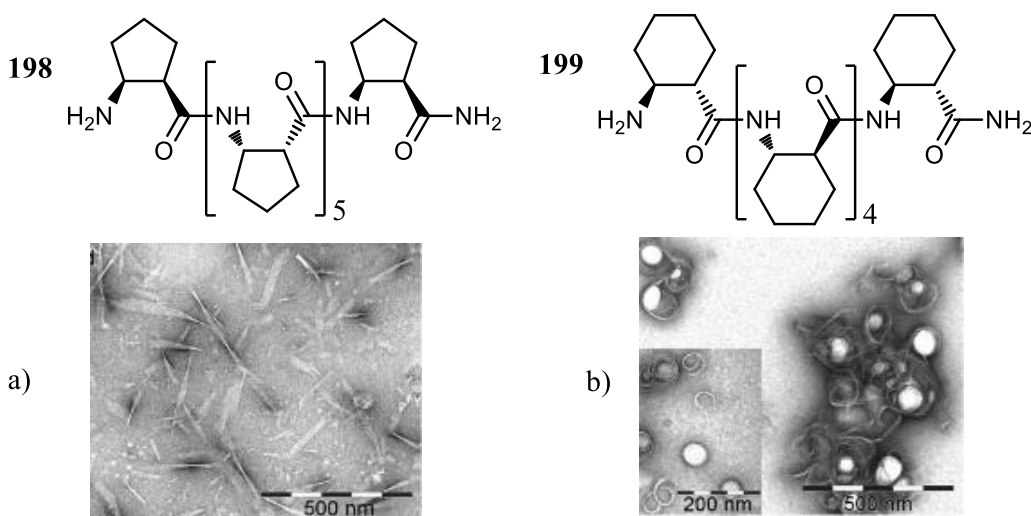


Figure 71 : Images en MET des structures secondaires de a) *cis*-(1*R*,2*S*)-ACPC₅ **198** (fibrilles à 1 mM dans l'eau), et b) *trans*-(1*S*,2*S*)-ACHC₄ **199** (vésicules à 1 mM dans le MeOH).¹⁶⁴

A partir des ACBC *cis* et *trans*, Ortuño et coll. ont préparés des β -peptides (**200**, **201**, **202**, **203** et **204**) pouvant adopter des structurations bien déterminée, qui ont dans certains cas formé des organogels (**Figure 72**). Le tetrapeptide **200-a**, préparé à partir de β -aminoacides cyclobutaniques *cis* a présenté des liaisons hydrogènes intramoléculaires conduisant à des pseudo-cycles à 6 chaînons, et induisant une structuration en ruban.¹³⁸ En solution à 1 mM dans le MeOH, ce tetrapeptide s'est organisé en fibrilles (**Figure 73-i**). Après chauffage du tetrapeptide **200-a** dans un mélange 3:2 acétate d'éthyle-hexane (1 mM) puis retour à température ambiante, il se forme un organogel stable.

Afin de vérifier l'influence du groupement protecteur sur la conformation observée et sur la tendance à s'auto-assembler, Ortuño et coll.¹⁶⁵ ont synthétisé le tetramère **200-b**. En plus, l'hexamère **201-a** et l'octamère **202-a** ont été aussi synthétisés et étudiés pour vérifier que les oligomères à chaînes plus longues ont les mêmes tendances conformationnelles que celles des plus petites chaînes. D'après les études conformationnelles en RMN, CD, et les études théoriques effectuées, ils ont montrés que les β -peptides constitués par les résidus de l'acide (1*R*.2*S*)-2-aminocyclobutanique adoptent des conformations en feuillets, indépendamment de leurs tailles et du groupement protecteur de l'amine terminal. La tendance de ces oligomères à s'auto-assembler en fibres nanométriques a été vérifiée par les images de MET, AFM et SPFM (scanning polarization force microscopy).

Ortuño et coll.¹⁶⁶ ont étudié après la tendance des dipeptides **203** et **204** à s'auto-assembler et à former des gels. Les images MEB (**Figure 73**) ont montré la formation d'un réseau de fibres pour chacun de ces peptides (**Figure 73-i et-ii**). Les calculs théoriques ont montré différents modes d'agrégation pour ces dipeptides : l'orientation de deux peptides consécutifs grâce à l'arrangement des liaisons hydrogène pour le premier dipeptide **203** se fait en h-h (head-to-head ou tête-tête), alors que pour le second dipeptide **204** l'orientation se fait en h-t (head-to-tail ou tête-bêche).

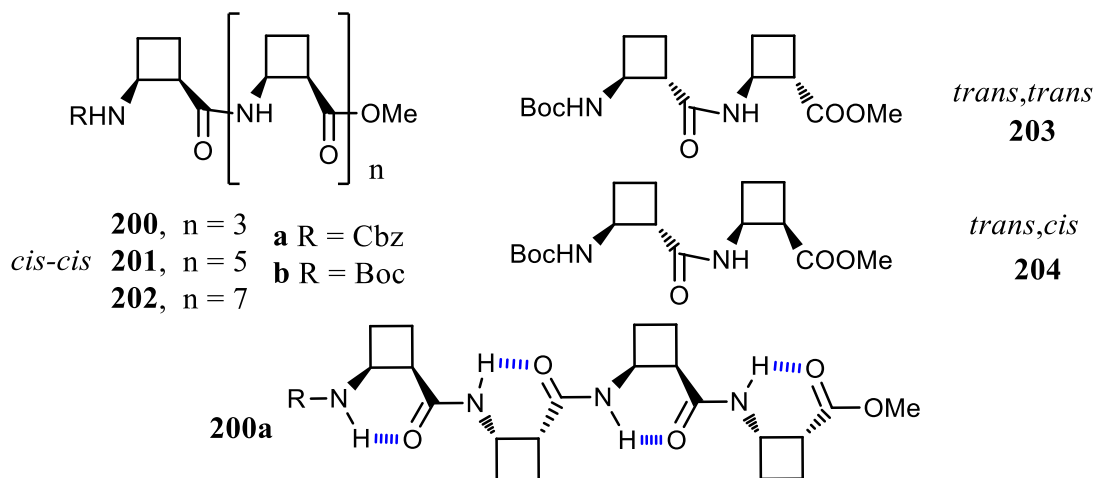


Figure 72 : Des β -peptides cyclobutaniques **200-204**. Les liaisons hydrogène sont montrés en bleu.

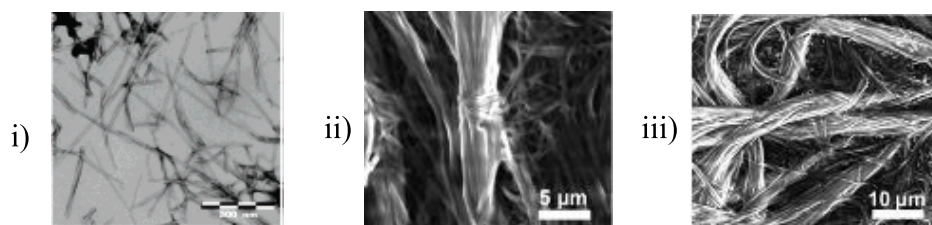


Figure 73 : i) Image MET des fibrilles formées dans des solutions à 1 mM du tetrapeptide **200-a** dans le MeOH ; ii) et iii) images MEB du xérogel des peptides **203** et **204** respectivement.¹⁶⁶

b- Les γ -aminoacides dans les LMWG

Les tripeptides **205** et **206** contenant un β,γ -diaminoacide sont décrits par Alezra et coll.¹³² Ces peptides ont une tendance à présenter en solution des liaisons-hydrogène conduisant à la formation de pseudo-cycle en C_9 et en C_7 (**Figure 74**).

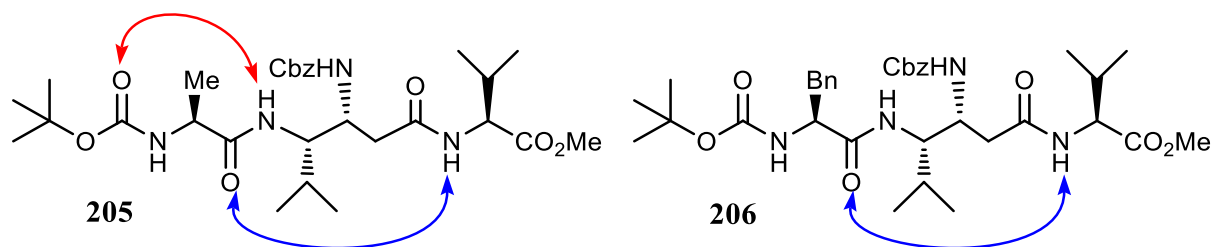


Figure 74 : Structures des α,γ,α -peptides **205** et **206** avec des liaisons hydrogène formant un pseudo-cycle en C_9 (bleu) ou en C_7 (rouge).

L'évaporation lente d'une solution du tripeptide **205** dans un mélange d'acétate d'éthyle-éther de pétrole (1:1) a conduit à la formation d'un solide fibreux. Les images obtenues par **MEB** montrent l'auto-assemblage de ce tripeptide sous forme d'un réseau de fibres (**Figure 75**). Le tripeptide **206**

montre aussi des propriétés macroscopiques exprimées par la formation d'un gel à 15 mM dans le CHCl_3 et le CH_2Cl_2 .

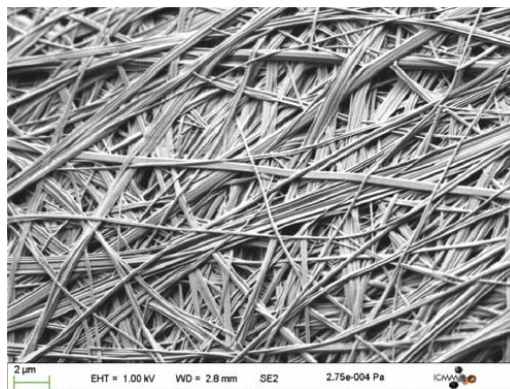


Figure 75 : L'image de **MEB** des fibrilles obtenues par le tripeptide **205**.¹³²

Ortuño et coll.¹³⁹ ont étudié le comportement de gélification de 3 tétrapeptides, formés de l'alternance de l'acide *cis*-(1*R*,2*S*)-2-aminocyclobutanique avec une glycine **207**, une β -alanine **208** ou un GABA **209** (**Figure 76**). Le composé **210** a lui été synthétisé pour évaluer l'influence du groupement ester terminal sur le repliement observé chez le peptide **209**.

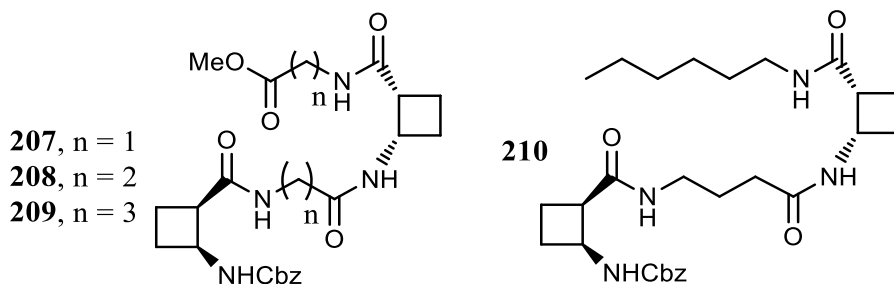


Figure 76 : Hétéropeptides à base d'acides aminés cyclobutaniques **207**, **208**, **209** et **210**.

Divers solvants ont été utilisés pour tester la gélification de ces peptides. L'utilisation du toluène a pu entraîner la formation des plus beaux gels avec la plus faible MGC (7-12 mM). Les morphologies, tailles et types des arrangements supramoléculaires de ces gels ont été analysés par l'intermédiaire de diverses techniques comme la MEB, le CD, et l'IR. Une modélisation moléculaire a été réalisée pour étudier l'auto-assemblage des gels formés à partir de l' α,β -tétrapeptide **207**. Cette étude propose un réarrangement en hélice de cet oligomère. Ces résultats sont en accord avec les expériences de RMN. Des clichés MEB ont été réalisés sur les xérogels formés à partir de solutions contenant les tétrapeptides (**207-210**) à 40 mM dans le toluène (**Figure 77**). Le tétrapeptide **207** donne lieu aux structurations les mieux définies (a), montrant des réseaux de fibres de largeurs variables (100-600 nm). Des structures homogènes moins définies sont

observées pour le tetrapeptide **208**, avec l'apparence de sphères rugueuses (b), et des réseaux de fibres plus larges sont trouvés pour le composé **209** (c). Le tetrapeptide **210** donne des structures larges et indéfinies (d), et cela est dû à la flexibilité de cette molécule, causée par l'absence du groupement ester dans le côté *C*-terminal, ce qui évite les interactions de liaison-hydrogène.

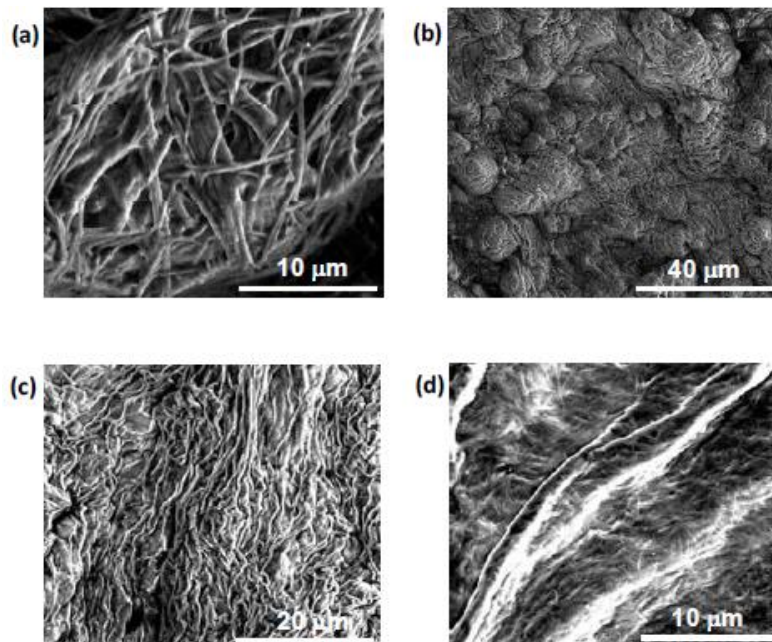


Figure 77 : Images MEB des tétrapeptides **207** (a), **208** (b), **209** (c) et **210** (d).¹³⁹

Jadhav et Gopi¹⁶⁷ ont préparé des tetra et pentapeptides (**211** et **212** respectivement) à partir de l'acide 4-aminoisocaproïque (Aic) (**Figure 78**). Ces deux peptides se sont structurés en feuillets. Ces peptides ont formé des gels stables et transparents dans le toluène, le benzène et l'isopropanol, et des gels opaques dans 95% de DMSO dans l'eau, 95% de DMF dans l'eau, et 95% de diglyme dans l'eau, avec un MGC de 2 mg/mL. Tous ces gels se sont montrés thermoréversibles. Les morphologies des xérogels de ces peptides dans le toluène ont été étudiées par microscopie à force atomique (AFM) et par MEB. Les images résultantes montrent un auto-assemblage en nano-fibrilles (**Figure 79**).

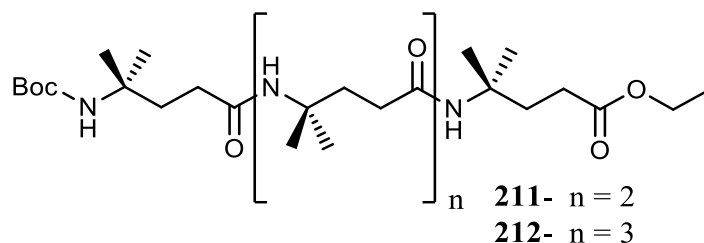


Figure 78 : Homo-oligomères à base d'Aic.

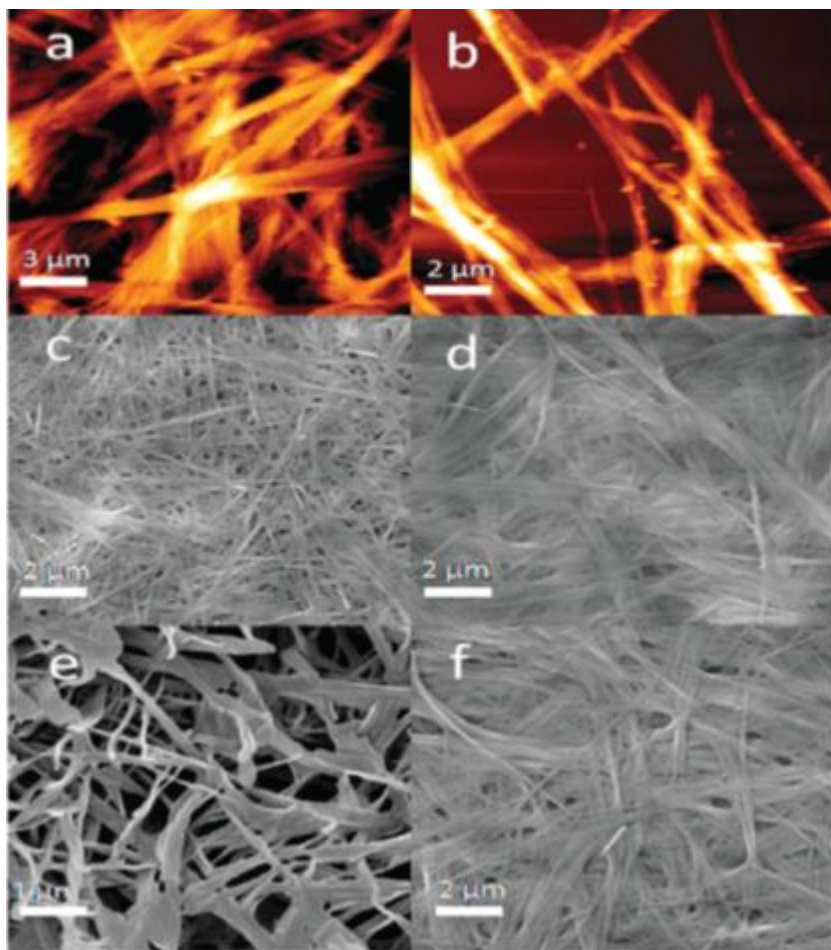


Figure 79 : Images AFM de **211** (a) et **212** (b) dans le toluène. Images en MEB de **211** (c) dans 95 % de DMSO dans l'eau) et (d) dans le toluène. Images MEB de **212** dans le MeOH (e) et dans le toluène (f).¹⁶⁷

VIII- Etudes des propriétés de gelation des peptides synthétisés

Nous avons testé le comportement des six oligomères synthétisés : le dimère (–)-**171**, le trimère (–)-**173** et le tétramère (–)-**178**, ainsi que leurs formes acides, le dimère (+)-**174**, le trimère (+)-**175** et le tétramère (+)-**179**, dans 16 solvants de natures différentes. Les solvants sélectionnés sont : 1 solvant aromatique (toluène), 1 alcane cyclique (cyclohexane), 3 solvants chlorés (chloroforme, 1,2-dichloroéthane et dichlorométhane), 3 alcools (méthanol, isopropanol et éthanol), 2 éthers (tetrahydrofuranne et diéthyléther), 1 ester (acétate d'éthyle), 1 cétone (acétone), et 4 autres solvants (acétonitrile, diméthylformamide, eau et PEG-400). Nous étions aussi curieux de savoir le comportement de ces peptides dans des produits alimentaires comme le sirop d'érable (origine Canada) composé majoritairement de saccharose, l'huile d'olives (origine Liban) composé d'acides gras, et du vin rouge (origine France) qui contient surtout de l'eau en mélange avec du sucre et de l'éthanol.

A- Procédure de gélification et test d'inversion

Nous avons suivi les procédures de gélification décrites dans la littérature,^{168,169,170} pour chaque combinaison de peptide et de solvant. Nous avons placé une quantité bien déterminée (1.0 ± 0.05 mg) du peptide dans un pilulier transparent (5 mm de diamètre). Un volume déterminé (100 μ l) du solvant sélectionné a été ajouté, et le milieu a été fermé par un bouchon en plastique. Le mélange a été mis dans un bain à sonication pendant 1-2 minute(s), puis chauffé (à une température inférieure au point d'ébullition du solvant) pour 5 minutes. Une deuxième sonication a parfois été nécessaire pour solubiliser le peptide. Les échantillons ne se solubilisant pas sous ces conditions ont été classés comme **insolubles**. Les mélanges ont ensuite été laissés à température ambiante (20 °C), et des observations de leurs états physiques ont été faites à $t = 4$ h puis à $t = 20$ h. A chaque observation, un test d'inversion a été effectué : le pilulier contenant la solution de peptide est retourné ouverture vers le bas. Un échantillon a été classé comme **gel** si aucun flux gravitationnel n'était observé. Sinon, l'échantillon a été classé comme **soluble** pour les solutions limpide, ou **précipité** pour des suspensions. Les résultats de ces tests sur les peptides (–)-**171**, (–)-**173** et (–)-**178** sont réunis dans le **Tableau 9**, et ceux sur leurs formes acides (+)-**174**, (+)-**175** et (+)-**179** sont réunis dans le **Tableau 10**.

Le dipeptide (–)-**171** s'est avéré être soluble dans la plupart des solvants organique à l'exception du diéthyle éther dans lequel il a précipité après 4 h. Dans le cyclohexane, le composé (–)-**171** a formé une suspension après 4 h, qui a évolué en gel à 24 h. Le tripeptide (–)-**173** montre une plus grande propension à gélifier. Nous avons observé la formation d'un gel dans 5 solvants organiques

différents : le toluène, le 1,2-dichloroéthane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et l'acétonitrile. Le tétramère (–)-**178** montre un comportement similaire dans le toluène et les solvants chlorés, alors qu'il est insoluble dans la plupart des autres solvants. Le comportement de ces peptides dans les produits alimentaires a ensuite été étudié. Les dipeptides ont été tous insoluble dans le sirop d'érable, et ils ont précipité dans le vin rouge. Nous avons observé une gélification du dimère (–)-**171** et du trimère (–)-**173** dans l'huile d'olives, alors que le tétrapeptide (–)-**178** y était insoluble (**Tableau 9**). Les MGC ont été calculés pour chaque gel obtenu. Les travaux de recherche sont en cours pour calculer les valeurs de MGC dans les produits alimentaires. Des photos des tests d'inversion ont été prises pour montrer l'allure des gels obtenus (**Figure 80**).

En ce qui concerne les acides, nous avons observé la formation d'une petite fraction de gel au fond de la solution du dimère (+)-**174** dans l'acétate d'éthyle, et du tripeptide (+)-**175** dans le toluène et le DMF. L'indication S/G dans le tableau réfère à ce type d'observation. Des gels ont été observés pour le dimère (+)-**174** dans le toluène et le tétramère (+)-**179** dans le chloroforme, le dichlorométhane et le DMF. Les travaux de recherche sont en cours pour calculer les valeurs exactes de MGC. Aucun hydrogel n'a pu être formé (**Tableau 10**).

Tableau 9 : Comportement des oligomères (–)-**171**, (–)-**173** et (–)-**178** dans différents solvants. G (x) : gel (MGC) en mg/mL) ; S : soluble ; I : insoluble ; P : précipité.

Classe de solvant	Solvant	Dimère (–)-171	Trimère (–)-173	Tetramère (–)-178
Aromatique	Toluène	S	G (7,4)	G (20,0)
Alcane	Cyclohexane	G (8,3)	I	I
Chloré	Chloroforme	S	S	G (41,7)
	1,2-dichloroéthane	S	G (14,5)	G (9,1)
	Dichlorométhane	S	G (50,0)	G (9,1)
Alcool	Méthanol	S	S	P
	Isopropanol	S	S	I
	Ethanol	S	P	P
Ether	Tetrahydrofuranne	S	S	I
	Diéthyléther	P	I	I
Ester	Acétate d'éthyle	S	G (6,7)	I
Cétone	Acétone	S	P	I
Autres	Acétonitrile	S	G (11,2)	I
	Diméthylformamide	S	S	P
	Eau	I	I	I
	PEG-400	S	S	I
Commercial	Sirop d'érable	I	I	I
	Huile d'olives	G	G	I
	Vin rouge	P	P	P

Pour chaque gel obtenu, nous avons calculé la concentration minimale de gélification. Pour cela, un volume de 25 μ L de solvant a été ajouté sur chaque gel, puis le mélange a été chauffé à une température inférieure au point d'ébullition du solvant, jusqu'à l'obtention d'une solution limpide. Une sonication est effectuée sur chaque solution. Après 20 h, lorsque le gel était reformé, le processus de dilution a été répété jusqu'à ce que la gélification n'ait plus lieu.

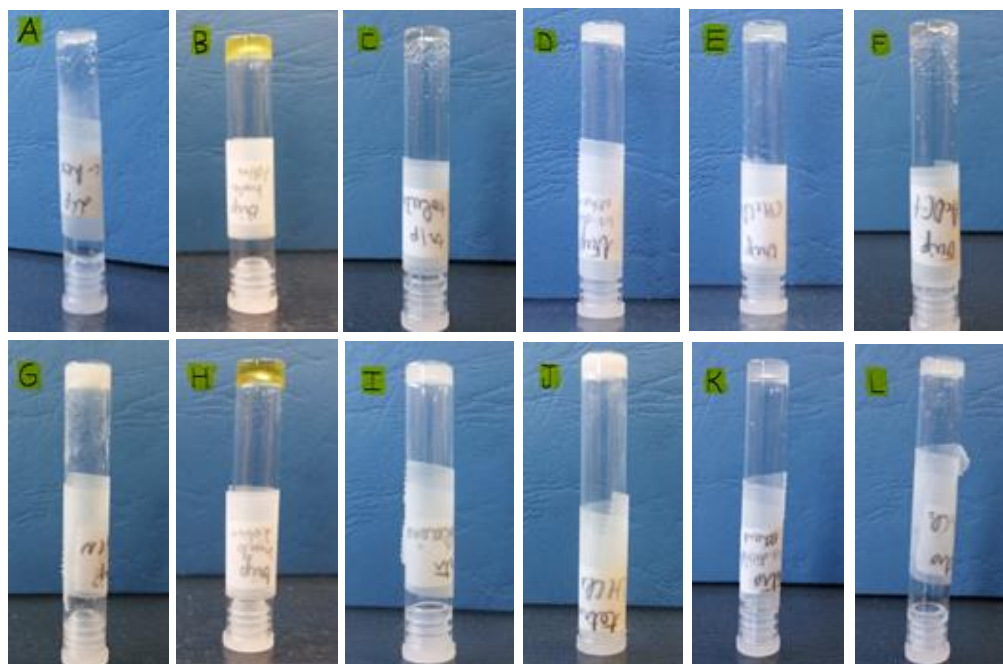


Figure 80 : Test d'inversion effectué sur des gels obtenus avec le dipeptide (-)-**171** : A (cyclohexane) et B (huile d'olive) ; le tripeptides (-)-**173** : C (toluène), D (1,2-dichloroéthane), E (dichlorométhane), F (acétate d'éthyle), G (acétonitrile) et H (huile d'olive) ; et de tétrapeptides (-)-**178** : I (toluène), J (chloroforme), K (1,2-dichloroéthane) et L (dichlorométhane).

Tableau 10 : Comportement des oligomères (+)-**174**, (+)-**175** et (+)-**179** dans différents solvants.
G : gel ; S/G : gel au fond de la solution ; S : soluble ; I : insoluble ; P : précipité

Classe de solvant	Solvant	Dimère (+)- 174	Trimère (+)- 175	Tetramère (+)- 179
Aromatique	Toluène	G	S/G	S
Alcane	Cyclohexane	I	I	I
Chloré	Chloroforme	S	I	G
	1,2-dichloroéthane	S	I	I
	Dichlorométhane	S	I	G
Alcool	Méthanol	S	I	S
	Isopropanol	S	I	I
	Ethanol	S	S	S

Ether	Tetrahydrofuranne	S	I	I
	Diéthyléter	I	I	I
Ester	Acétate d'éthyle	S/G	I	I
Cétone	Acétone	S	I	I
Autres	Acétonitrile	S	I	I
	Diméthylformamide	S	S/G	G
	Eau	I	I	S
	PEG-400	S	S	S

a- Test de thermo-réversibilité

Pour chaque gel obtenu, un test de thermo-réversibilité a été effectué sur les gels de concentration minimale. Pour cela, le gel a été chauffé à une température inférieure au point d'ébullition du solvant, jusqu'à l'obtention d'une solution limpide. La solution a été laissée à température ambiante afin de voir si un gel se reformait. Cette opération a été répétée 2 fois. Tous les gels ont présenté une thermo-réversibilité.

B- Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique de microscopie électronique qui utilise le principe des interactions électrons-matière pour produire des images de la surface d'un échantillon en haute résolution. Le microscope électronique à balayage utilise un faisceau d'électrons qui interagissent avec chaque point de l'échantillon par un balayage du microscope. Cette interaction provoque la formation d'électrons secondaires de plus faibles énergies. Ces électrons sont amplifiés puis convertis en un signal électrique, qui permet de reconstruire la typographie de l'échantillon et de fournir une image en relief. Ainsi, la morphologie microstructurale d'un gel peut être examinée et analysée. Pour cela, quelques échantillons des gels obtenus ont été examinés par MEB.

Des gels ont ainsi été préparés à partir de solutions à concentrations minimales de gélification, puis transformés en xérogels par évaporation des solvants. Les images présentées dans la **Figure 81** montrent que les peptides (–)-**171**, (–)-**173** et (–)-**178** s'auto-assemblent en des structurations formant des fibrilles, que ce soit dans le cyclohexane, le toluène, le 1,2-dichloroéthane ou l'acétonitrile.

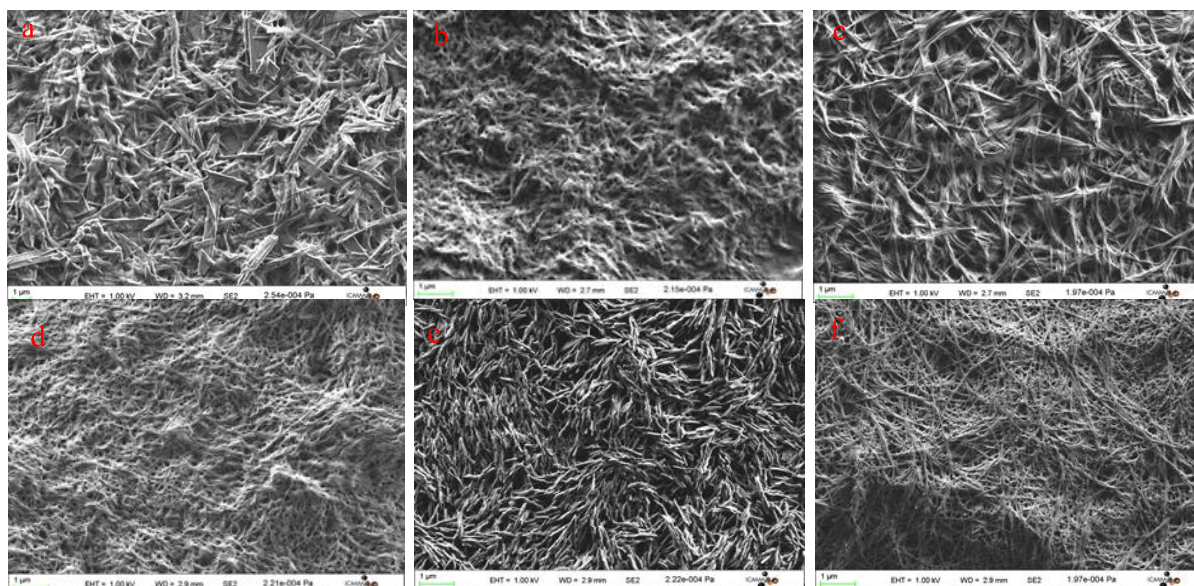


Figure 81 : Images de MEB des xérogels du a) dipeptide (–)-**171** dans le cyclohexane, b, c et d) tripeptide (–)-**173** dans le toluène, le 1,2-dichloroéthane et l'acétonitrile respectivement, e et f) tetrapeptide (–)-**178** dans le toluène et le le 1,2-dichloroéthane respectivement.

D'autres images ont été prises par la MEB pour des solutions de dipeptide et tétrapeptide (la concentration de la solution de tetrapeptide étant inférieure à MGC). On peut voir des plaques de tailles plus larges que celles observées avec le xérogel du dipeptide (–)-**171**, avec des structurations non définies. Les images en MEB du tétrapeptide montrent une structuration filamenteuse, composée de longues et fines fibrilles (**Figure 82**). Des analyses en MEB du tripeptide (–)-**173** sont en cours dans le laboratoire.

Ces analyses ont montré que les peptides (–)-**171**, (–)-**173** et (–)-**178** ainsi que leurs formes acides peuvent s'auto-assembler et former des gels dans certains solvants. Les gels obtenus ont tous été thermoréversibles. Les images en MEB des xérogels des peptides (–)-**171**, (–)-**173** et (–)-**178** montrent une structuration en fibrilles.

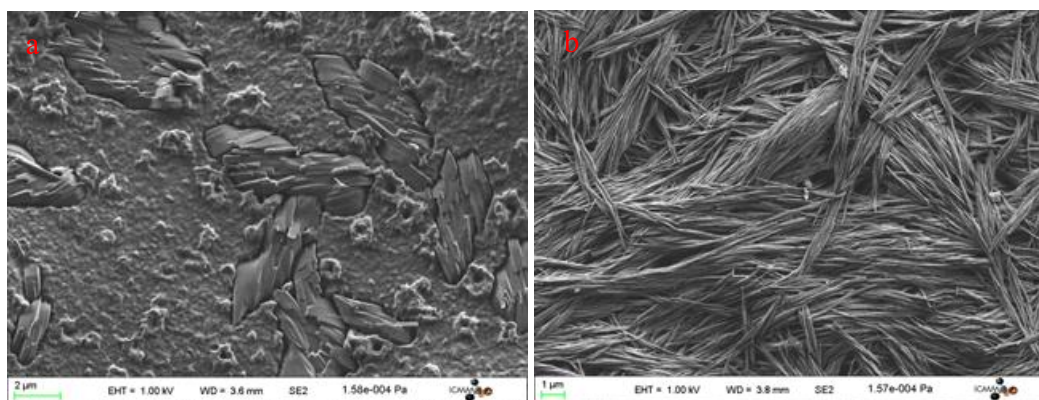


Figure 82 : Images de MEB des solutions du a) dipeptide (–)-**171** et du b) tetrapeptide (–)-**178**, dans du chloroforme à 40 mM.

Conclusion

Le premier objectif de ce travail a été la synthèse efficace et reproductible de nouveaux analogues cyclobutaniques énantiopurs du GABA. Pour la synthèse des deux énantiomères du *cis*-^{3,4}CB-GABA, nous avons mis au point deux stratégies de synthèses qui impliquent toutes les deux une étape-clé de photocycloaddition [2+2] qui permet de créer le cycle à 4 chaînons :

- La première consiste en une homologation du (\pm)-Boc-*cis*-ACBC, par réduction de la fonction acide en alcool, suivie d'une substitution de l'alcool en nitrile, et d'une hydrolyse de ce dernier pour conduire au (\pm)-Boc-*cis*-^{3,4}CB-GABA avec un rendement global de 26 %.
- La deuxième est une synthèse multi-étape à partir du caprolactame, et passant par une étape de photocycloaddition [2+2] intramoléculaire, suivie d'une hydrogénation, et d'une hydrolyse, avec un rendement global de 37 %.

Un dédoublement du (\pm)-*cis*-^{3,4}CB-GABA racémique par l'intermédiaire de la (-)-4-méthyl-5-phényl-2-oxazolidinone (-)-**160**, nous a permis d'obtenir les deux énantiomères optiquement purs. Ces deux voies de synthèse du (+)-*cis*-^{3,4}CB-GABA et du (-)-*cis*-^{3,4}CB-GABA sont actuellement les 1^{ères} à être publiées dans la littérature.

Le second objectif de cette thèse a été de mettre au point la synthèse de γ -oligomères du (1*R*,2*S*)-*cis*-^{2,3}CB-GABA. Ainsi, nous avons préparé les dipeptides (-)-**170** et (-)-**171**, le tripeptide (-)-**173** et le tetrapeptide (-)-**178**.

Nous avons caractérisé ces quatre pseudopeptides par les techniques de RMN 1D et 2D, IR, DC, RX et en MEB. Les analyses ont montré qu'il n'existe pas d'interactions de faibles énergie de type liaison hydrogène inter-résidu au sein de ces oligomères. Les spectres de diffraction aux RX ont mis en évidence un arrangement des dipeptides (-)-**170** et (-)-**171** selon un empilement en antiparallèle de ces molécules.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence la propriété de gélification de ces oligomères dans différents solvants organiques. Des solutions et des gels formés à partir de ces peptides ont été analysés en MEB et les clichés obtenus ont montré une organisation du dipeptide (-)-**171** et du tetrapeptide (-)-**178** en fibrilles. Les acides (+)-**174**, (+)-**175** et (+)-**179** correspondants aux peptides (-)-**171**, (-)-**173** et (-)-**178**, ont été préparés et l'étude de leur propriété de gélification a été initiée et est poursuivie actuellement au laboratoire.

La première perspective découlant de ces travaux est la synthèse des énantiomères du *trans*-^{3,4}CB-GABA. Celle-ci pourrait se faire par homologation du (\pm)-Boc-*trans*-ACBC dont la synthèse est connue dans la littérature, suivie d'un dédoublement du (\pm)-Boc-*trans*-^{2,3}CB-GABA racémique obtenu et une déprotection de l'amine. Les oligomères du *cis*- et *trans*-^{3,4}CB-GABA ainsi que ceux du *trans*-^{2,3}CB-GABA pourront ensuite être préparés. Il sera alors intéressant de mener une étude conformationnelle comparative des oligomères de ces quatre analogues à conformation restreinte du GABA.

Experimental Section

General methods

All moisture sensitive reactions were performed under an argon atmosphere using oven-dried glassware. Evaporations were performed under reduced pressure using a rotary evaporator.

Instrumentation

Nuclear magnetic resonance (**NMR**) data were acquired on Bruker AC250, AM300, AM360 or DRX400 spectrometers. NMR spectra were measured in deuterated solvents (CDCl_3 , DMSO-d_6 , C_6D_6) on a Bruker DRX spectrometer, operating at 400, 360, and 250 Hz for ^1H and ^{13}C . Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm), solvent signals were used for δ calibration (CDCl_3 : ^1H δ = 7.27 ppm, ^{13}C δ = 77 ppm; DMSO-d_6 : ^1H δ = 2.50 ppm, ^{13}C δ = 40.0 ppm; C_6D_6 : ^1H δ = 7.16 ppm, ^{13}C δ = 128 ppm; D_2O : ^1H δ = 4.79 ppm). Coupling constant values (J) are given in hertz (Hz). Multiplicity abbreviations: s (singlet), d (doublet), t (triplet), dd (double doublet), m (multiplet), bs (broad singlet), qu (quintuplet).

Melting points (**MP**) were recorded on a heating deck microscope (Reichert).

Infrared (**IR**) spectra were measured in CHCl_3 solution on a Spectrum line (Perkin Elmer) spectrometer, and solid infrared spectra (DGTS-Mode) were recorded on a Vertex 70 FT-IR spectrometer equipped with an ATR accessory; only structurally peaks (ν) are present in cm^{-1} .

Optical rotations were measured in solution, on a Jasco P-1010 polarimeter, using a 10 cm quartz cell. Values for α_D were obtained with the D-line of sodium at the indicated temperature T , using solutions of concentration (C) in units of g/100 mL.

High-resolution mass spectrum (**HRMS**) data were recorded in positive mode on a Bruker MicroTOFq instrument in electrospray ionization mode.

Elementary Analyses (**Anal**) were carried out on a Thermofinnigan FlashEA 1112 apparatus at the Microanalytical Laboratory, UMR 7565 (gif sur Yvette).

Ultra-violet (**UV**) spectra were recorded in acetonitrile solution on a Specord 205 spectrophotometer.

Chromatography

Preparative chromatography was performed manually (flash) on columns of SDS silica gel 60A, 35-70 μm mesh, or automatically piloted by an ISCO Combiflash system (Combiflash) on columns of Macherey-Nagel silica gel 60, 35-70 μm mesh or 15-40 μm mesh (ultra-flash).

Analytical TLC plates (silica gel 60 F₂₅₄, Merck) were visualized by UV fluorescence at 254 nm and the stained using basic aqueous KMnO_4 , ninhydrine solution or phosphomolybdic acid.

Chemical and solvents

All solvents as well as some liquid reagents were purified by distillation under argon, as follows:

DMSO, DMF, Et_3N and DIPEA were distilled from CaH_2 and stored under argon atmosphere.

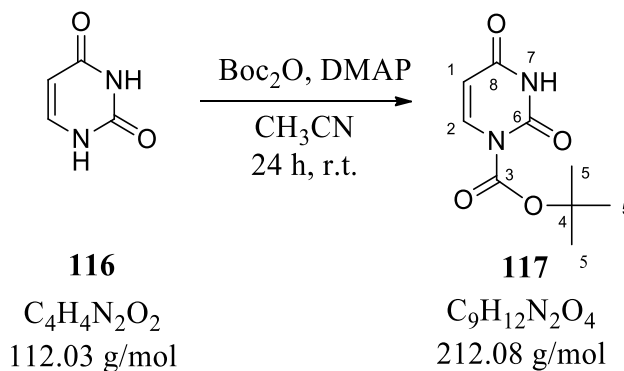
MeOH and *t*-BuOH were distilled from sodium under a nitrogen atmosphere.

THF and Et_2O were distilled on sodium/benzophenone under a nitrogen atmosphere.

CH_3CN was directly used from commercial bottles.

I. Synthesis of
***cis*- γ -amino-3,4-cyclobutanic acid**
***cis*-^{3,4}CB-GABA**

Tert*-butyl 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-1-carboxylate **117*



To a solution of uracil (3.361 g, 30.00 mmol) in acetonitrile (150 mL) at room temperature were added DMAP (0.037 mg, 0.30 mmol) and Boc_2O (6.550 g, 30.00 mmol). The solution was stirred at room temperature for 24 h. The solvent was concentrated under reduced pressure to provide a white solid (5.530 g, 26 mmol). The compound **117** was directly used in the next reaction without purification. The spectral data were identical to those reported previously.¹⁷¹

Yield: 87 %

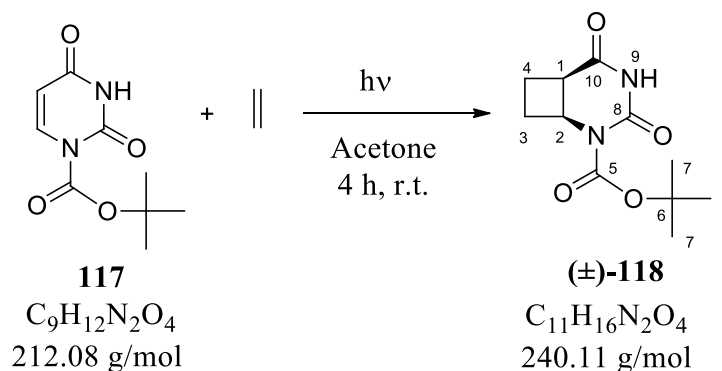
TLC R_f (Et_2O): 0.10

^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.52 (s, 9H, H-5), 5.70 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1), 7.90 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-2), 11.40 (bs, 1H, H-7).

^{13}C NMR (62.8 MHz, CDCl_3): δ = 27.8 (C-5), 86.1 (C-4), 103.6 (C-1), 140.8 (C-2), 147.9, 148.5 (C-3, C-6), 163.2 (C-8).

UV/Vis (CH_3CN): λ ($\epsilon \text{ M}^{-1}, \text{cm}^{-1}$) = 208 (11908), 250 (16021).

(±)-Cis-tert-butyl 3,5-dioxo-2,4-diazabicyclo[4.2.0]octane-2-carboxylate (±)-118



A solution of crude **117** (5.312 g, 25.05 mmol) in acetone (1 L) was degassed with an argon stream in a cylindrical water-cooled reactor during 30 min, and then saturated with ethylene for 30 min. The solution was then irradiated for 4 h with a 400 W medium-pressure mercury lamp fitted with a Pyrex filter, while ethylene was bubbled through. The solvent was then removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of *c*-C₆H₁₂/EtOAc as eluent from 80:20 to 100:0. A white solid was isolated (4.571 g, 19.04 mmol). The spectral data were identical to those reported previously.⁹¹

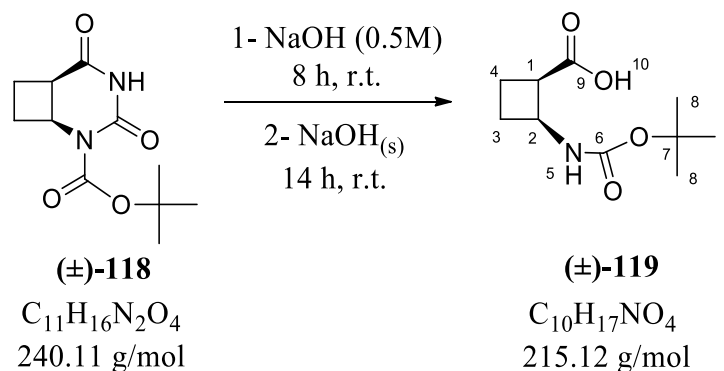
Yield: 66 % (two steps)

TLC R_f (Et₂O): 0.75

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.56 (s, 9H, H-7), 2.13-2.25 (m, H-3), 2.27-3.39 (m, 1H, H-4, 1H, H-3), 2.30-2.54 (m, 1H, H-4), 3.32-3.38 (m, 1H, H-1), 4.74-4.81 (m, 1H, H-2), 7.63 (bs, 1H, H-9).

¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃): δ = 21.4 (C-4), 27.9 (C-7), 30.2 (C-3), 39.4 (C-1), 48.8 (C-2), 84.3 (C-6), 148.7 (C-9), 150.7 (C-5), 172.2 (C-10).

(±)-Cis-2-[[*tert*-butoxy]carbonyl]amino}cyclobutane-1-carboxylic acid (±)-119



Compound (±)-**118** (3.175 g, 13.34 mmol) was dissolved in a 0.5 M aqueous solution of NaOH (130 mL) and stirred for 8 h at room temperature. The mixture was cooled to 0 °C and solid NaOH (13.330 g, 333.50 mmol, 25 eq) was added portion wise. The mixture was stirred for 14 h at room temperature, then was cooled to 0 °C and acidified slowly with a concentrated aqueous solution of HCl to pH = 1. The aqueous layer was extracted with EtOAc (5×75 mL). The combined organic layers were dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated to afford compound (±)-**119** as a white solid (2.150 g, 10.01 mmol). The crude acid (±)-**119** was directly used in the next reaction without purification. The spectral data were identical to those reported previously.¹⁰⁶

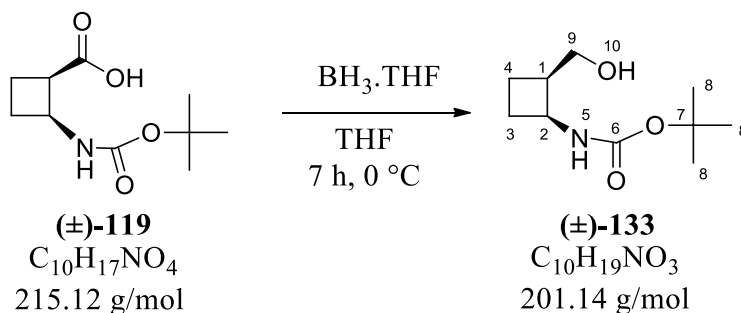
Yield: 74%

TLC R_f (EtOAc / EP 1:1): 0.25

¹H NMR (360 MHz, DMSO): δ = 1.35 (s, 9H, H-8), 1.71-1.82 (m, 1H, H-4), 1.87-1.95 (m, 1H, H-4), 2.10-2.21 (m, 2H, H-3), 3.10-3.22 (m, 1H, H-1), 4.19-4.29 (m, 1H, H-2), 6.89-6.91 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H-5), 11.97 (bs, 1H, H-10).

¹³C NMR (90 MHz, DMSO): δ = 18.06 (C-4), 27.51 (C-3), 28.66 (C-8), 45.54 (C-2), 46.78 (C-1), 78.19 (C-7), 154.89 (C-6), 174.45 (C-9).

(±)-Cis-tert-butyl N-[2-(hydroxymethyl)cyclobutyl]carbamate (±)-133



To a stirred solution of (±)-**119** (0.250 g, 1.160 mmol) in anhydrous THF (20 mL), cooled at 0 °C under an atmosphere of argon, was added $BH_3 \cdot THF$ (5.7 mL, 5.719 mmol, 4.93 eq), and the reaction mixture was maintained at 0 °C for 7 h. Excess borane was quenched by dropwise addition of water. The resulting solution was warmed to room temperature and diluted with brine (20 mL), extracted with EtOAc (2×40 mL). Combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated in vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 30:70 to 100:0. A white solid was obtained (0.100 g, 0.50 mmol).

Yield: 43 %

TLC R_f (EtOAc / EP 1:1): 0.51.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.44 (s, 9H, H-8), 1.57-1.70 (m, 1H, H-3), 1.72-1.97 (m, 2H, H-4), 2.31-2.61 (m, 1H, H-3, 1H, H-10), 2.64-2.78 (m, 1H, H-1), 3.60 (dd, J = 11.3 Hz, J = 4.1 Hz, 1H, H-9), 3.76 (dd, J = 11.3 Hz, J = 8.5 Hz, 1H, H-9), 4.20 (q, J = 7.5 Hz, 1H, H-2), 5.11 (bs, 1H, H-5).

^{13}C NMR (62.8 MHz, $CDCl_3$): δ = 18.8 (C-4), 27.7 (C-3), 28.4 (C-8), 41.5 (C-1), 47.7 (C-2), 62.4 (C-9), 79.7 (C-7), 156.4 (C-6).

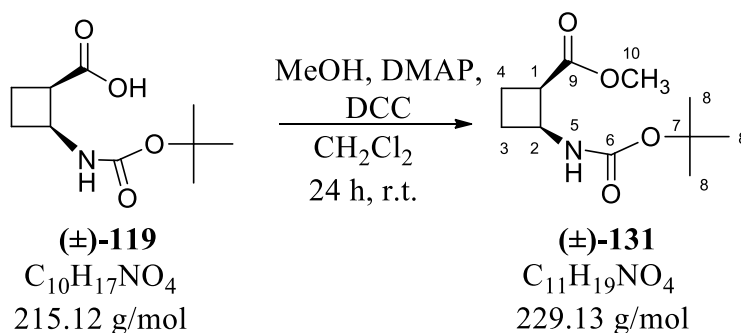
MP: 75 °C.

IR (solid): (C-C, C-N) 1168, (C-O) 1286, (C=O) 1533, (C=O) 1683, (C-H) 2980, (N-H, O-H) 3310 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[C_{10}H_{19}NO_3 + Na]^+$ 224.1257 ; found 224.1260 (-1.1 ppm).

Anal: calcd for $C_{10}H_{19}NO_3$: C, 59.84; H, 9.45; N, 6.69; found: C, 59.68; H, 9.52; N, 6.96.

(±)-Cis-Methyl 2-[[*tert*-butoxy]carbonyl]amino}cyclobutane-1-carboxylate (±)-131



To a solution of (±)-**119** (0.7 g, 3.26 mmol) in dry CH_2Cl_2 (40 mL) under argon, were added DMAP (0.0397 g, 0.326 mmol, 0.1 eq) then MeOH (726 μ L, 17.93 mmol, 5.5 eq). After cooling at 0 °C in an ice bath, DCC (0.7387 g, 3.586 mmol, 1.1 eq) was introduced and the stirring was maintained at 0 °C for 5 min then at room temperature for 24 h. The crude was filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. Compound (±)-**131** was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 30:70 to 100:0 to afford a colorless oil (0.618 g, 2.70 mmol). The spectral data were identical to those reported previously.¹⁰⁶

Yield: 83 %.

TLC R_f (EtOAc / EP 1:1): 0.84.

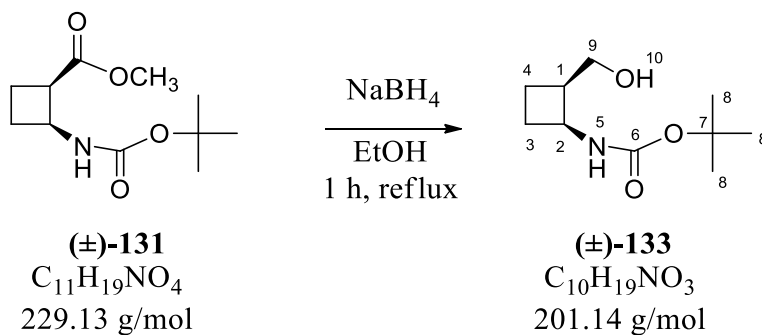
¹H NMR (360 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.42 (s, 9H, H-8), 1.92-2.01 (m, 2H, H-4), 2.22 (qu, J = 10.8 Hz, 1H, H-3), 2.39-2.39 (m, 1H, H-3), 3.36-3.41 (m, 1H, H-1), 3.71 (s, 3H, H-10), 4.39-4.52 (m, 1H, H-2), 5.33-5.36 (bs, 1H, H-5).

¹³C NMR (90 MHz, $CDCl_3$): δ = 18.5 (C-4), 28.3 (C-8), 29.5 (C-3), 45.2 (C-1), 45.8 (C-2), 51.7 (C-10), 79.3 (C-7), 154.7 (C-6), 174.6 (C-9).

MP: 47 °C.

HR-MS: m/z calcd for $[C_{11}H_{19}NO_4+Na]^+$ 252.1206 ; found 252.1204 (+0.8 ppm).

(±)-*Cis-tert*-butyl *N*-[2-(hydroxymethyl)cyclobutyl]carbamate (±)-133



A stirred solution of (±)-**131** (0.992 g, 4.33 mmol) in absolute EtOH (20 mL) was cooled in an ice bath, then $NaBH_4$ (1.637 g, 43.30 mmol, 10 eq) was added in small portions. The reaction mixture was heated slowly to reflux for 1 h. The mixture was cooled to room temperature, and the lumps that formed were broken up to give slurry that was poured into brine (20 mL). The mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure then extracted with Et_2O (6×15 mL). The insoluble solid was extracted by stirring in Et_2O (4×20 mL) for 2 h. The combined ether extracts were dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated to give a white solid that was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 30:70 to 100:0. A white solid was obtained (0.840 g, 4.18 mmol).

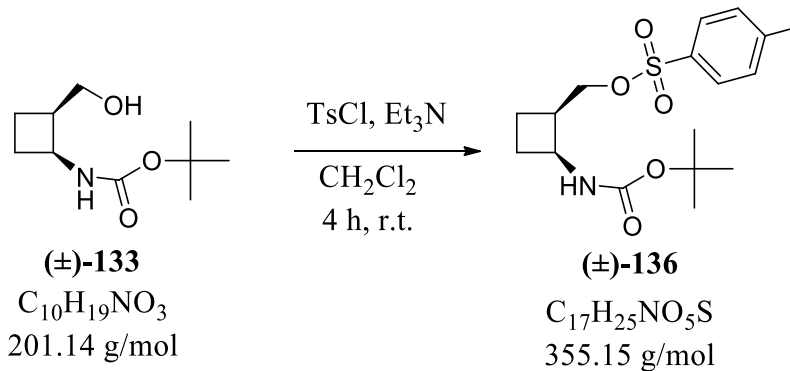
Yield: 97 %.

TLC R_f (EtOAc / EP 1:1): 0.51.

Spectral data page 132.

MP: 74 °C.

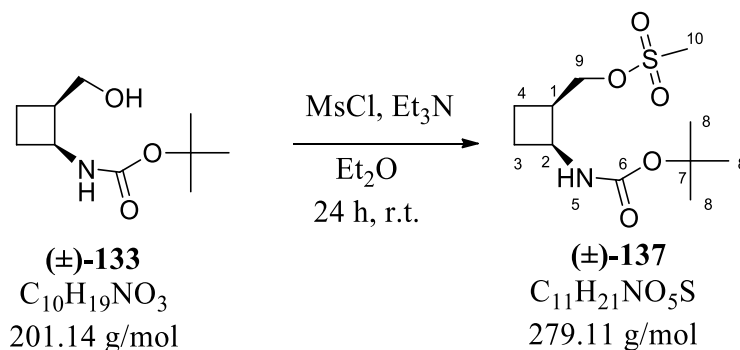
(±)-*Cis-tert*-butyl N-[2-({[(4-methylbenzene)sulfonyl]oxy}methyl)cyclobutyl]carbamate (±)-136.



To a solution of alcohol (±)-**133** (0.100 g, 0.50 mmol) in CH_2Cl_2 (700 μL) was added Et_3N (230 μL , 1.67 mmol). The mixture was cooled to 0 °C, and TsCl (0.152 g, 0.80 mmol) was added. The reaction was allowed to reach room temperature and was stirred for 4 h under a stream of argon. The resulting mixture was diluted with CH_2Cl_2 (22 mL) and washed with saturated aqueous solution of NaHCO_3 (2×15 mL) then with saturated aqueous solution of NH_4Cl (2×15 mL). Organic layer was dried over MgSO_4 . Solvent was evaporated to afford brown oil (0.192 g). This crude product was used in the next reaction without any purification.

TLC R_f (EtOAc / EP, 50:50):.0.78

(±)-Cis-tert-butyl N-{2-[(methanesulfonyloxy)methyl]cyclobutyl}carbamate (±)-137.



Compound (±)-**133** (2.766 g, 13.76 mmol) was dissolved in anhydrous Et_2O (230 mL) under an argon atmosphere. The reaction mixture was then cooled in an ice bath. Then Et_3N (4.9 mL, 34.95 mmol, 2.54 eq) was added, then MsCl (2.5 mL, 31.79 mmol, 2.31 eq), and the reaction was stirred for 24 h at room temperature. The solution was filtered and washed with Et_2O . Solvent was concentrated, and the crude product was purified with flash chromatography (ISCO) using EtOAc/EP (30:70) as eluent, to give product (±)-**137** as a white solid (3.725 g, 13.35 mmol).

Yield: 97 %.

TLC Rf (EtOAc / EP, 60:40): 0.69.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.42 (s, 9H, H-8), 1.61-1.73 (m, 1H, H-4), 1.88-2.05 (m, 1H, H-3, 1H, H-4); 2.29-2.40 (m, 1H, H-3), 2.82-2.89 (m, 1H, H-1), 3.03 (s, 3H, H-10), 4.32-4.43 (m, 2H, H-9, 1H, H-2), 4.90 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-5).

^{13}C NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 17.9 (C-4), 28.0 (C-3), 28.3 (3C-8), 37.3 (C-10), 39.0 (C-1), 46.0 (C-2), 69.4 (C-9), 79.5 (C-7), 155.1 (C-6).

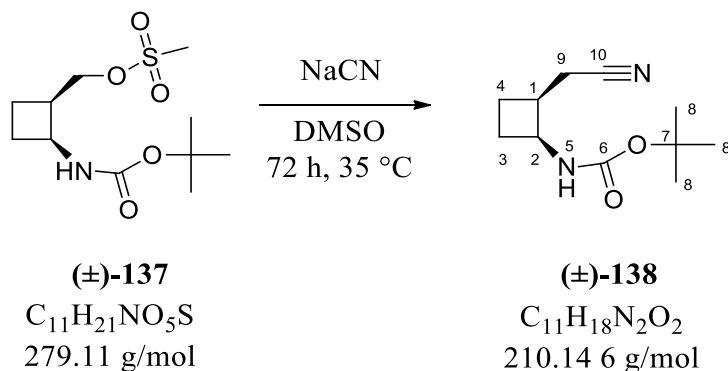
MP: 97 °C.

IR (solid): (C-C, C-N) 1163, (S=O) 1178, (S=O) 1339, (C=O) 1512, (C=O) 1683, (C-H) 2991, (NH) 3372 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[C_{11}H_{21}NO_5S+Na]^+$ 302.1046; found 302.1033 (-1.8 ppm).

Anal: calcd for $C_{11}H_{21}NO_5S$: C, 47.29; H, 7.58; N, 5.01; found: C, 46.42; H, 7.63; N, 5.20.

(±)-Cis-tert-butyl N-[2-(cyanomethyl)cyclobutyl]carbamate (±)-138



To a stirred solution of (±)-**137** (0.100 g, 0.36 mmol) in dry DMSO (2 mL) under argon atmosphere, was added finely pulverized dried NaCN in vacuo at 120 °C during 20 h¹¹⁷ (0.175 g, 3.58 mmol, 10 eq) in small portions at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 72 h. Solvent was evaporated under reduced pressure. Water (5 mL) was then added, and the resulting mixture was extracted with Et₂O (4 × 3 mL). Combined Et₂O extracts were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using EtOAc/EP (20:80) as eluent to afford white solid (m = 0.069 g, 0.33 mmol).

Yield: 92 %.

TLC R_f (EtOAc / EP 1:1): 0.82.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.44 (s, 9H, H-8), 1.69-1.75 (m, 1H, H-4), 1.99-2.16 (m, 2H, H-3, H-4), 2.37-2.41 (m, 1H, H-3), 2.44-2.63 (m, 2H, H-9), 2.78-2.90 (m, 1H, H-1), 4.27-4.33 (m, 1H, H-2), 4.77 (bs, 1H, H-5).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 17.6 (C-9), 20.7 (C-4), 26.5 (C-3), 28.3 (3C-8), 36.5 (C-1), 46.6 (C-2), 79.7 (C-7), 119.2 (C-10), 155.1 (C-6).

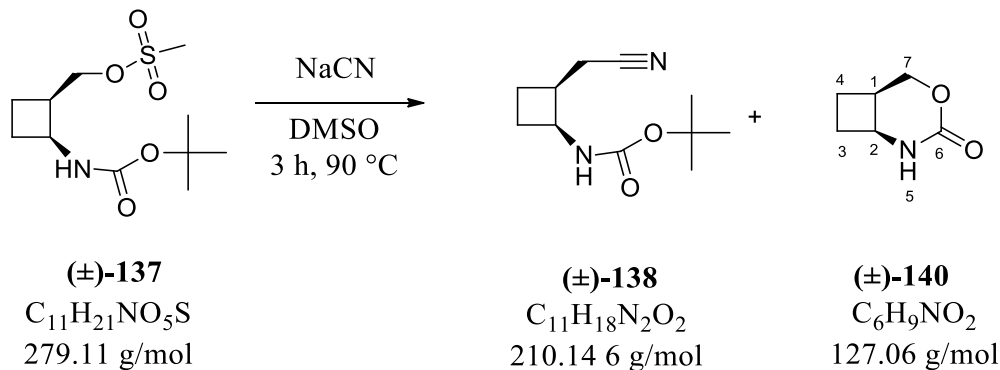
MP: 151.3 °C.

IR (solid): (C-C, C-N) 1161, (C-O) 1275, (C=O) 1525, (C=O) 1680, (C≡N) 2248, (C-H) 2984, (N-H) 3342 cm⁻¹.

HR-MS: m/z calcd for [C₁₁H₁₈N₂O₅+Na]⁺ 233.1260 ; found 233.1260 (+ 0.1 ppm).

Anal: calcd for C₁₁H₁₈N₂O₅: C, 62.83; H, 8.63; N, 13.32; found: C, 62.91; H, 8.74; N, 13.19.

(±)-Cis-4-oxa-2-azabicyclo[4.2.0]octan-3-one (±)-140



To a solution of compound (±)-**137** (0.117 g, 0.42 mmol) in DMSO (700 μ L) was added pulverized NaCN (0.106 g, 2.15 mmol, 5 eq) in small portions. The reaction was heated to 90 $^{\circ}$ C and stirred for 3 h. Distilled water (5 mL) was added. Aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (4×5 mL). Combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography using gradient of EtOAc/EP as eluent from 20:80 to 100:0 to afford white solid as compound (±)-**138** (0.010 g, 0.045 mmol) and yellow solid as compound (±)-**140** (0.015 g, 0.12 mmol).

(±)-Cis-tert-butyl N-[2-(cyanomethyl)cyclobutyl]carbamate (±)-**138**:

Yield: 11 %. **Spectral data** page 137.

(±)-Cis-4-oxa-2-azabicyclo[4.2.0]octan-3-one (±)-**140**

Yield: 27 %.

TLC Rf (EtOAc): 0.2.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.93-2.19 (m, 2H, H-4, 1H, H-3), 2.30-2.47 (m, 1H, H-3), 2.79-2.98 (m, 1H, H-1), 4.01 (m, 1H, H-2), 4.25 (dd, J = 5.6 Hz, J = 11.2 Hz, 1H, H-7), 4.34 (dd, J = 4.8 Hz, J = 11.2 Hz, 1H, H-7), 5.85 (bs, 1H, H-5).

^{13}C NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 19.1 (C-4), 29.8 (C-3), 31.3 (C-1), 48.2 (C-2), 68.4 (C-7), 191.6 (C-6).

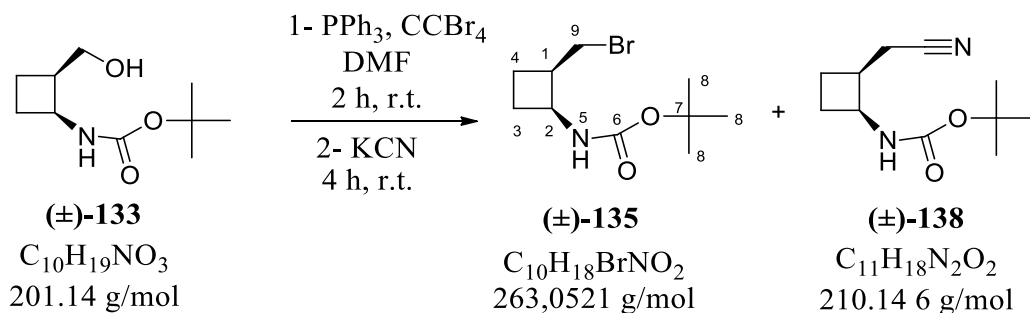
MP: 75 $^{\circ}$ C.

IR (solid): (C-C, C-N) 1053, (C-O) 1288, (C=O) 1707, (C-H) 2920, (N-H) 3226 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[C_6H_9NO_2+Na]^+$ 150.0525 ; found 150.0521 (+ 3.1 ppm).

Anal: calcd for $C_{11}H_{18}N_2O_5$: C, 56.68; H, 7.13; N, 11.02; found: C, 56.23; H, 7.14; N, 9.51

(±)-Cis-tert-butyl N-[2-(bromomethyl)cyclobutyl]carbamate (±)-135



To a solution of alcohol **(±)-133** (0.100 g, 0.50 mmol) in DMF (2 mL) were added triphenylphosphine (0.391 g, 1.49 mmol, 3 eq) and tetrabromomethane (0.496 g, 1.49 mmol, 3 eq) at room temperature. The reaction was stirred for 2 h. After complete conversion of alcohol on TLC plates, KCN (0.324 g, 4.98 mmol, 10 eq) was added and the reaction was stirred for 4 h. Solvent was evaporated. The remaining product was washed with saturated NaCl (4 mL), and the aqueous layer was extracted with EtOAc (4 × 3 mL). Combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated in vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 20:80 to 100:0. A white solid was obtained (0.044 g) which contains an inseparable mixture of the brominated product **(±)-135** with the nitrile product **(±)-138**.

(±)-Cis-tert-butyl N-[2-(bromomethyl)cyclobutyl]carbamate (±)-135.

TLC Rf (EtOAc / EP, 50:50): 0.82

1H NMR (360 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.44 (s, 9H, H-8), 1.62-1.73 (m, 1H, H-4), 1.88-2.06 (m, 2H, H-3, H-4), 2.27-2.38 (m, 1H, H-3), 2.93 (m, 1H, H-1), 3.44 (dd, J = 9.8 Hz, J = 22.4 Hz, 1H, H-9), 3.57 (dd, J = 9.8 Hz, J = 6.1 Hz, 1H, H-9), 4.31 (m, 1H, H-2), 4.77 (bs, 1H, H-5).

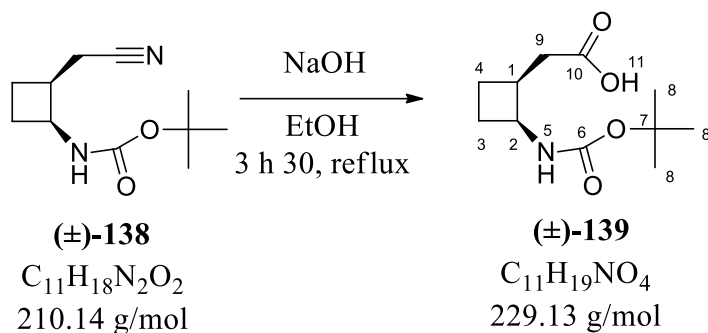
^{13}C NMR (90 MHz, $CDCl_3$): δ = 21.2 (C-4), 27.2 (C-3), 28.3 (C-8), 34.0 (C-9), 42.0 (C-1), 47.2 (C-2), 79.5 (C-7), 155.2 (C-6).

HR-MS: m/z calcd for $[C_{10}H_{18}BrNO_2+Na]^+$ 286.0413; found 286.0415 (-0.5 ppm).

(±)-Cis-tert-butyl N-[2-(cyanomethyl)cyclobutyl]carbamate (±)-138

Spectral data page 137.

(±)-Cis-2-(2-[[*tert*-butoxy)carbonyl]amino}cyclobutyl)acetic acid (±)-139



To a stirred solution of (±)-**138** (0.277 g, 1.32 mmol) in absolute EtOH (7 mL) was added an aqueous solution of NaOH (6 M, 7 mL). The reaction mixture was heated to reflux for 3 h 30. Ethanol was evaporated under reduced pressure. The resulting mixture was cooled in an ice bath, and then acidified with an aqueous solution of HCl (2 M, 30 mL). Aqueous layer was extracted with EtOAc (4 × 20 mL). The combined organic extracts were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 30:70 to 100:0. A white solid was obtained (0.220 g, 0.96 mmol).

Yield: 73 %.

TLC R_f (EtOAc / EP 1:1): 0.28.

1H NMR (360 MHz, $CDCl_3$) : δ = 1.43 (s, 3H, H-8), 1.53-1.61 (m, 1H, H-4), 1.87-1.94 (m, 1H, H-3), 1.96-2.05 (m, 1H, H-4), 2.32 (m, 1H, H-3), 2.43 (dd, J = 15.8 Hz, J = 9.0 Hz, 1H, H-9), 2.55 (dd, J = 15.8 Hz, J = 6.8 Hz, 1H, H-9), 2.91 (m, 1H, H-1), 4.04-4.30 (m, 1H, H-2), 4.85 (bs, 0.7H, H-5), 6.07 (bs, 0.3H, H-5), 11.00 (bs, 1H, H-11).

^{13}C NMR (90 MHz, $CDCl_3$): δ = 21.2 (C-4), 27.2 (C-3), 28.3 (C-8), 34.2 (C-9), 36.7 (C-1), 46.8 (C-2), 79.4 (C-7), 155.2 (C-6), 177.7 (C-10).

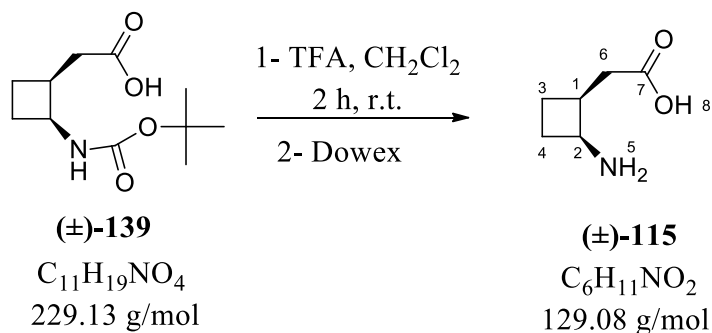
MP: 117 °C.

IR (solid): (C-C) 1155, (C-N) 1168, (C=O) 1275, (C=O) 1684, (C-H) 2986, (NH, OH) 3361 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[C_{11}H_{19}NO_4 + Na]^+$ 252.1206 ; found 252.1212 (- 2.4 ppm).

Anal: calcd for $C_{11}H_{19}NO_4$: C, 57.62; H, 8.35; N, 6.11; found: C, 57.74; H, 8.46; N, 6.31.

(±)-Cis-2-aminocyclobutyl]acetic acid (±)-115



A solution of (±)-**139** (0.150 g, 0.66 mmol) in CH_2Cl_2 (12 mL) was cooled at 0 °C, then TFA (1.0 mL, 13.10 mmol 20 eq) was added. The solution was stirred within 2 h at room temperature. The solution was deposited on a cation-exchange column (Dowex 50W×8, H^+ , 50-100 mesh). The column was washed with water until the eluent was neutral, then the product was eluted with 3 M NH_4Cl solution. After pooling and evaporation of appropriate fractions, pure amino acid (±)-**115** was obtained as a white solid (0.080 g, 0.62 mmol).

Yield: 95 %.

TLC Rf: (EtOH / H_2O 8:2): 0.57.

1H NMR (300 MHz, D_2O): 1.59-1.69 (m, 1H, H-4), 1.95-2.08 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 2.20-2.28 (m, 1H, H-3), 2.31 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 14.8$ Hz, 1H, H-6), 2.40 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 14.8$ Hz, 1H, H-6), 2.76-2.87 (m, 1H, H-1), 3.83 (q, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-2).

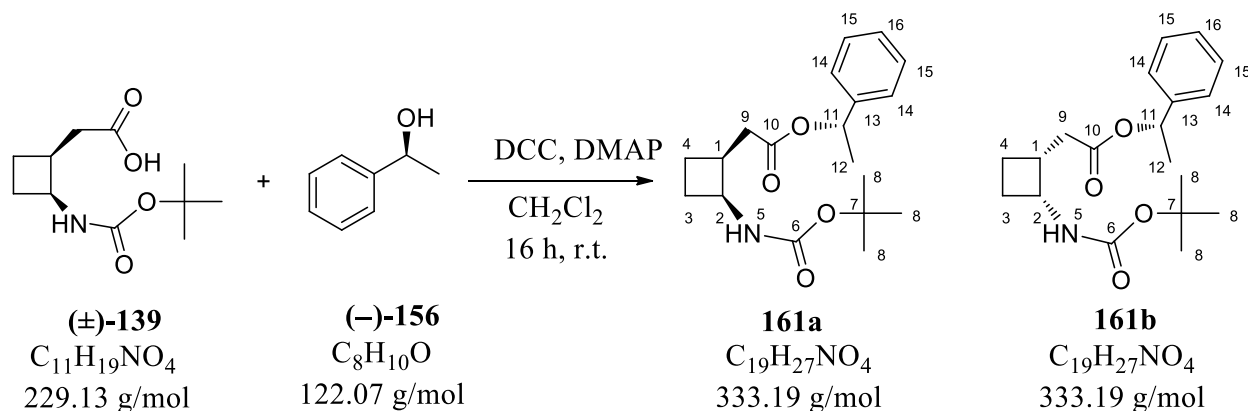
^{13}C NMR (62.8 MHz, D_2O): 21.6 (C-4), 23.8 (C-3), 34.4 (C-1), 37.2 (C-6), 47.5 (C-2), 180.8 (C-7).

MP: 165°C.

IR (solid): (C-O) 1425, (N-H) 1530 and 1564, (C=O) 1677, (C-H) 2944, (N-H, O-H) 3419 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[C_6H_{11}NO_2+H]^+$ 130.0863 ; found 130.0864 (-1.0 ppm).

(±)-Cis- (1*S*)-1-Phenylethyl 2-(2-[[(*tert*-butoxy)carbonyl]amino]cyclobutyl)acetate **161a, **161b****



To a solution of acid (±)-**139** (0.039 g, 0.17 mmol) in dry CH_2Cl_2 (1 mL) under argon, were added DMAP (0.002 g, 0.02 mmol, 0.1 eq) and (1*S*)-1-phenylethanol (-)-**156** (25 μ L, 0.20 mmol, 1.2 eq). After cooling at 0 °C in an ice bath, DCC (0.042 g, 0.20 mmol, 1.2 eq) was introduced and the solution was stirred at room temperature for 16 h. The mixture was filtered and solvent was evaporated under reduced pressure. Compounds **161a** and **161b** were purified by flash chromatography using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 10:90 to 100:0 to afford colorless oil (0.036 g, 0.11 mmol). The diastereoisomers were not separable.

Yield: 65 %.

TLC Rf: (EtOAc / EP 1:1): 0.9.

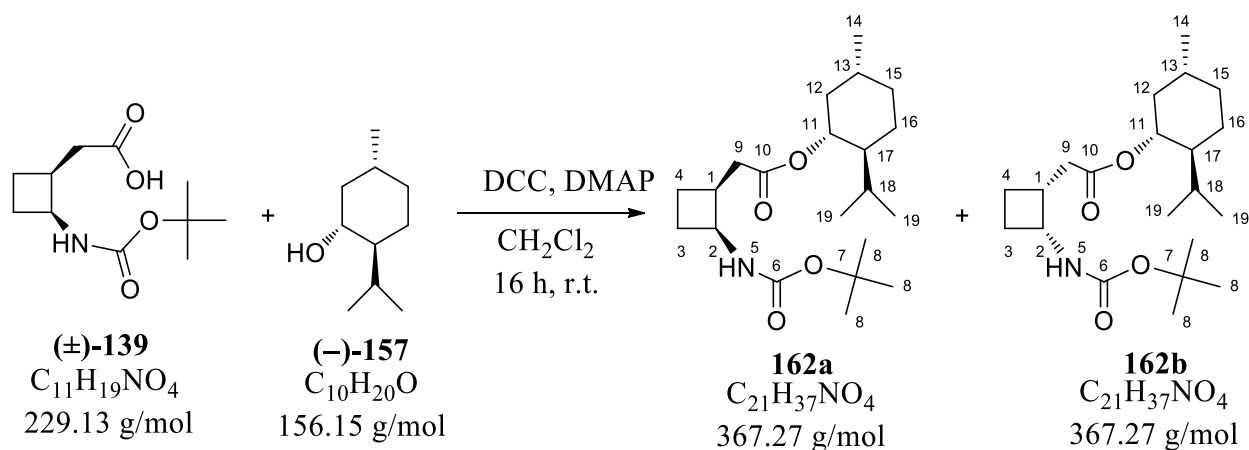
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.42, (s, 0.53 9H, H-8), 1.44 (s, 0.47 9H, H-8), 1.54 (d, J = 6.6 Hz, 3H, H-12), 1.49-1.64 (m, 1H, H-4), 1.78-2.05 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 2.27-2.34 (m, 1H, H-3), 2.36-2.60 (m, 2H, H-9), 2.92 (m, 1H, H-1), 4.24-4.40 (m, 1H, H-2), 4.84 (bs, 1H, H-5), 5.88 (q, J = 6.1 Hz, 1H, H-11), 5.89 (q, J = 6.1 Hz, 1H, H-11), 7.29-7.37 (m, 5H, 2H-14, 2H-15, H-16).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 21.1 (C-4), 22.2 (C-12), 27.6 (C-3), 28.4 (C-8), 34.6, 34.7 (2 C-9), 36.9 (C-1), 46.8 (C-2), 72.4 (C-11), 79.4, (C-9), 126.0, 127.8, 128.5, 128.9 (2C-14, 2C-15, C-16), 153.1 (C-6), 172.1 (C-10).

IR (solid): (C-C, C-N) 1163, (C-O) 1251, (C=O, C=C) 1530, (C=O) 1710, (C-H) 2978, (N-H) 3361 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[C_{19}H_{27}NO_4+Na]^+$ 356.1832 ; found 356.1849 (-4.8 ppm).

(1*S*,2*R*,5*S*)-5-Methyl-2-(propan-2-yl)cyclohexyl 2-[(1*S*,2*S*)-2-[(*tert*-butoxy)carbonyl]amino} cyclobutyl]acetate **162a and (1*S*,2*R*,5*S*)-5-methyl-2-(propan-2-yl)cyclohexyl 2-[(1*R*,2*R*)-2-[(*tert*-butoxy)carbonyl]amino}cyclobutyl]acetate **162b****



To a solution of (±)-**139** (0.100 g, 0.44 mmol) in dry CH_2Cl_2 (2 mL) under argon, were added DMAP (0.005 g, 0.04 mmol, 0.1 eq) then (L)-menthol (–)-**157** (0.103 g, 0.66 mmol, 1.5 eq). After cooling at 0 °C in an ice bath, DCC (0.108 g, 0.52 mmol, 1.2 eq) was introduced and the solution was stirred at room temperature for 16 h. The mixture was filtered and the solvent was evaporated. The crude was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 10:90 to 100:0. Compounds **162a** and **162b** were obtained as colorless oil (0.121 g, 0.33 mmol). The diastereoisomers were partially separated by crystallization in cyclohexane which afforded one diastereoisomer enantioenriched (0.030 g, 0.08 mmol).

Yield: 75 %.

TLC Rf: (EtOAc / EP 1:1): 0.90.

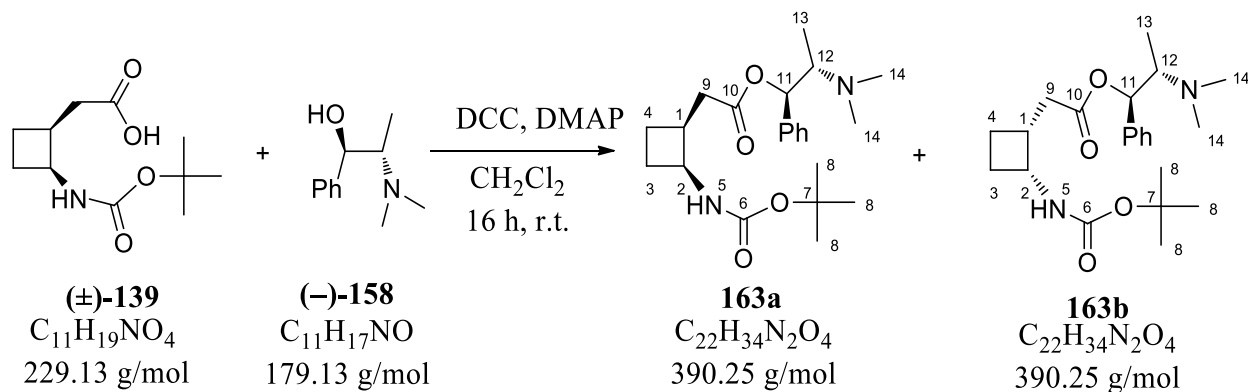
IR (solid): (C-C, C-N) 1195, (C-O) 1255, (C=O) 1519, (C=O) 1704, (C-H) 2953, (N-H) 3358 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{NO}_4 + \text{Na}]^+$ 390.2615 ; found 390.2616 (-0.4 ppm).

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): 0.76 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, H-14), 0.90 (d, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 6H, H-19), 0.91 (d, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 6H, H-19), 0.81-1.12 (m, 2H, H-16, 1H, H-12, 1H, H-15), 1.29-1.58 (m, 1H, H-15, 1H, H-12, 1H, H-4, 1H, H-13), 1.44 (s, 9H, H-8), 1.65-1.70 (m, 1H, H-13, 1H, H-4), 1.82-2.04 (m, 1H, H-17, 1H, H-3, 1H, H-4, 1H, H-18), 2.32-2.37 (m, 1H, H-3), 2.38 (dd, $J = 10.0 \text{ Hz}$, $J = 15.0 \text{ Hz}$, 1H, H-9), 2.51 (dd, $J = 5.7 \text{ Hz}$, $J = 14.9 \text{ Hz}$, 1H, H-9), 2.91 (m, 1H, H-1), 4.30 (m, 1H, H-2), 4.65-4.73 (m, 1H, H-11), 4.91 (m, 1H, H-5).

^{13}C NMR (62.8 MHz, CDCl_3): 16.2 (C-14), 20.7, 21.0 (C-19), 21.1 (C-4), 22.0, 22.2 (C-16), 23.2, 23.3 (C-18), 27.6 (C-3), 28.4 (C-8), 31.4, 31.6 (C-13), 34.2 (C-15), 34.6, 34.8 (C-9), 37.0 (C-1), 40.9 (C-12), 45.1, 47.0 (C-17), 46.8, 50.2 (C-2), 71.5, 74.3 (C-11), 79.3 (C-7), 155.1 (C-6), 172.4 (C-10).

(1*R*,2*S*)-2-(Dimethylamino)-1-phenylpropyl 2-[(1*S*,2*S*)-2-[[*tert*-butoxy]carbonyl]amino} cyclobutyl]acetate **163a and **(1*R*,2*S*)-2-(dimethylamino)-1-phenylpropyl 2-[(1*R*,2*R*)-2-[[*tert*-butoxy]carbonyl]amino}cyclobutyl]acetate **163b**.****



To a solution of (±)-**139** (0.100 g, 0.44 mmol) in dry CH_2Cl_2 (2 mL) under argon, were added DMAP (0.005 g, 0.04 mmol, 0.1 eq) and (1*R*,2*S*)-(-)-*N*-Methylephedrine (0.118 g, 0.66 mmol, 1.5 eq). After cooling at 0 °C in an ice bath, DCC (0.108 g, 0.52 mmol, 1.2 eq) was introduced and the solution was stirred at room temperature for 16 h. The mixture was filtered and solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 05:95 to 100:0. Compounds **163a** and **163b** were obtained as colorless oil (0.088 g, 0.22 mmol). The diastereoisomers were not separable.

Yield: 51 %.

TLC Rf: (EtOAc): 0.22.

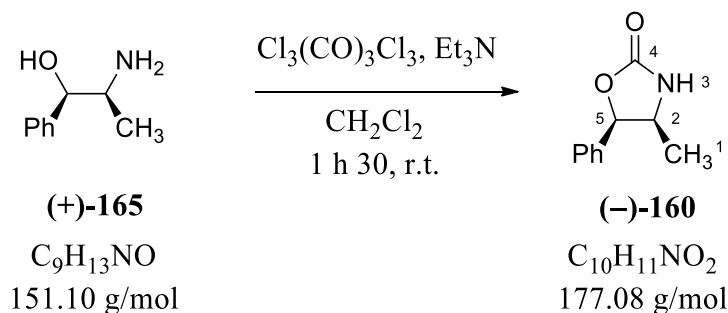
^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 1.05 (d, J = 7.2 Hz, 3H, H-13), 1.42 (s, 0.55 9H, H-8), 1.43 (s, 0.45 9H, H-8), 1.53-1.60 (m, 1H, H-4), 1.82-2.01 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 2.27 (s, 0.51 6H, H-14), 2.28 (s, 0.49 6H, H-14), 2.21-2.35 (m, 1H, H-3), 2.41-2.50 (m, 2H, H-9), 2.53-2.60 (m, 2H, H-9), 2.81-2.92 (m, 1H, H-12, 1H, H-1), 4.20-4.37 (m, 1H, H-2), 4.91 (bs, 0.55 1H, H-5), 5.08 (bs, 0.45 1H, H-5), 5.94 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-11), 5.95 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-11), 7.22-7.33 (m, 5H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (62.8 MHz, CDCl_3): δ = 9.4, 9.6 (2C-13), 21.1, 21.2 (2C-4), 27.2, 27.3 (2C-3), 28.3 (C-8), 33.9 (C-9), 34.8 (C-9), 36.7, 36.8 (2C-1), 41.2, 41.4 (2C-14), 46.7 (C-2), 63.6, 63.7 (2C-12), 75.4, 75.5 (2C-11), 79.4 (C-7), 126.1, 126.2, (2C_{Ar}), 127.4 (C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 139.9, 140.0 (2C_{Ar}), 155.1, 155.2 (2C-6), 171.7 (C-10).

IR (solid): (C-C, C-N) 1157, (C-O) 1251, (C=O, C=C) 1536, (C=O) 1708, (C-H) 2975, (N-H) 3356 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$ 391.2591 ; found 391.2579 (+ 3.1 ppm).

(4*S*,5*R*)-(-)-4-Methyl-5-phenyl-1,3-oxazolidin-2-one (±)-160



To a solution of (1*S*,2*R*)-(+)-Norephedrine **(+)-165** (1.00 g, 6.67 mmol) in CH_2Cl_2 (19 mL) was added Et_3N (2 mL, 14.67 mmol, 2.2 eq). The solution was cooled at 4 °C, and a solution of triphosgene (3 mL, 2.33 mmol, 0.35 eq) in CH_2Cl_2 (3 mL) was added dropwise during 5 minutes. The mixture was stirred for 1h 30 min at room temperature. Saturated NH_4Cl solution (4 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 20 minutes. The two layers were separated, and the organic layer was washed with water (3×4 mL). Combined aqueous extracts were extracted with CH_2Cl_2 (3×8 mL). Combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 05:95 to 100:0. White solid was obtained (1.068 g, 6.03 mmol). The spectral data were identical to those reported previously.¹²⁷

Yield: 90 %.

TLC Rf (Et_2O): 0.44.

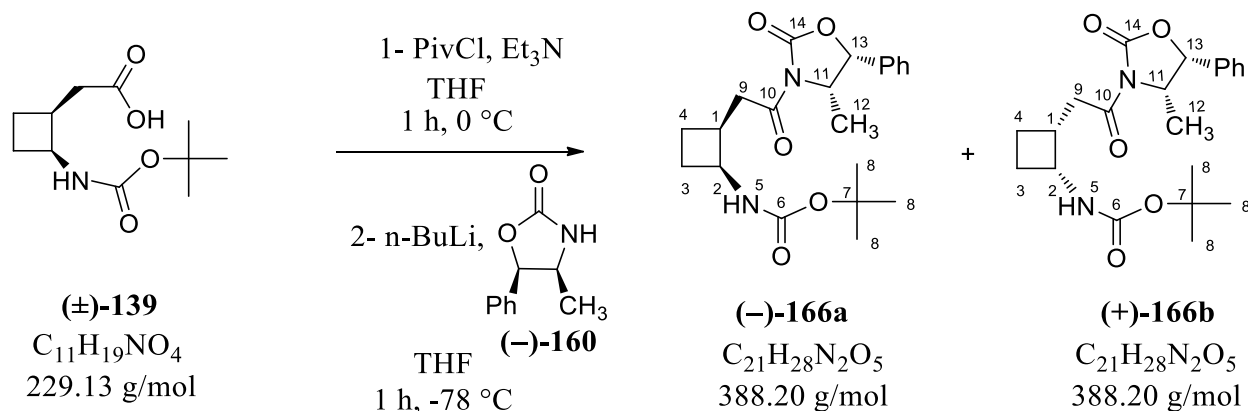
^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 0.82 (d, J = 6.5 Hz, 3H, H-1), 4.17-4.28 (m, 1H, H-2), 5.73 (d, J = 7.8 Hz, 6.03 (bs, 1H, H-3), 7.27-7.41 (m, 5H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (62.5 MHz, CDCl_3): δ = 17.4 (C-1), 52.4 (C-2), 80.9 (C-5), 125.9, 128.4, 134.9 (C_{Ar}), 159.6 (C-4).

$[\alpha]_D^{24}$ (C = 1.00; CHCl_3): -161.

HR-MS: m/z calcd for $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_2 + \text{Na}]^+$ 200.0682; found 200.0678 (1.9 ppm).

***Tert*-butyl N-[(1*S*,2*S*)-2-{2-[(4*S*,5*R*)-4-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,3-oxazolidin-3-yl]-2-oxoethyl}cyclobutyl]carbamate (–)-166a and *tert*-butyl N-[(2*R*)-2-{2-[(4*S*,5*R*)-4-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,3-oxazolidin-3-yl]-2-oxoethyl}cyclobutyl]carbamate (+)-166b.**



To a solution of compound (±)-**139** (1.000 g, 4.37 mmol) in THF (40 mL) was added Et₃N (1200 μL, 8.74 mmol, 2 eq). The mixture was cooled to –78 °C, and then PivCl (565 μL, 4.59 mmol, 1.05 eq) was slowly added. The reaction was stirred for 1 h at 0 °C. Separately, n-BuLi (2.73 mL, 4.37 mmol, 1 eq) was added to a solution of oxazolidinone (–)-**160** (0.774 g, 4.37 mmol, 1 eq) in THF (20 mL) at –40 °C and the mixture was stirred for 5 min under a stream of Argon, then transferred by cannula to the first mixture cooled to –78 °C and placed under a stream of Argon. The reaction was stirred for 1 h at –78 °C. The remaining solution was then put at 0 °C and saturated solution of NaHCO₃ (20 mL) was added. THF was evaporated and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (4 × 20 mL). Combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography (ISCO - silica ultra-Flash) using a gradient of Et₂O/EP as eluent from 15:55 to 60:40 to afford compound (–)-**166a** (0.679 g, 1.75 mmol) and compound (+)-**166b** (0.830 g, 2.14 mmol) as white solids were obtained (1.068 g, 6.03 mmol).

Yield: 89 %.

IR (solid): (C–C, C–N) 1168 and 1195, (C–O) 1348, (C=O) 1519, (C=O, C=C) 1704, (C=O) 1780, (C–H) 2978, (N–H) 3359 cm^{–1}.

HR-MS: m/z calcd for [C₂₁H₂₈N₂O₅+Na]⁺ 411.1890 ; found 411.1891 (–0.1 ppm).

Anal: calcd for C₂₁H₂₈N₂O₅: C, 64.93; H, 7.27; N, 7.21; found: C, 64.46; H, 7.36; N, 7.49.

Tert-butyl N-[(1*S*,2*S*)-2-{2-[(4*S*,5*R*)-4-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,3-oxazolidin-3-yl]-2-oxoethyl} cyclobutyl]carbamate (–)-**166a**

TLC Rf: (Et₂O / EP 1:1): 0.44.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): 0.90 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-12), 1.45 (s, 9H, H-8), 1.51-1.59 (m, 1H, H-4), 1.84-2.10 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 2.29-2.34 (m, 1H, H-3), 2.96-3.14 (m, 1H, H-9, 1H, H-1), 3.18-3.26 (m, 1H, H-9), 4.21-4.31 (m, 1H, H-2), 4.76 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-11), 4.83 (bs, 1H, H-5), 5.68 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-13), 7.29-7.43 (m, 5H, H_{Ar}).

¹³C NMR (62.8 MHz, CDCl₃): 14.6 (C-12), 21.4 (C-4), 27.4 (C-3), 28.4 (C-8), 35.1 (C-1), 36.4 (C-9), 47.2 (C-2), 54.8 (C-11), 79.0 (C-13), 79.3 (C-7), 125.6 (2C_{Ar}), 128.7 (2C_{Ar}), 129.1 (C-17), 133.4 (C-14), 153.3 (C-18), 155.2 (C-6), 171.9 (C-10).

MP: 121 °C.

HR-MS: *m/z* calcd for [C₂₁H₂₈N₂O₅+Na]⁺ 411.1890 ; found 411.1881 (2.4ppm).

[α]_D²⁵ (C = 1,02; CHCl₃): -69.

Tert-butyl N-[(2*R*)-2-{2-[(4*S*,5*R*)-4-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,3-oxazolidin-3-yl]-2-oxoethyl} cyclobutyl]carbamate (–)-**166b**

TLC Rf: (Et₂O / EP 1:1): 0.35.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): 0.88 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, H-12), 1.41 (s, 9H, H-8), 1.47-1.54 (m, 1H, H-4), 1.85-2.08 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 2.27-2.38 (m, 1H, H-3), 2.91 (dd, *J* = 16.4 Hz, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-9), 3.00-3.12 (m, 1H, H-1), 3.30 (dd, *J* = 16.1 Hz, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-9), 4.31-4.36 (m, 1H, H-2), 4.75 (q, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-11), 4.93 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-5), 5.67 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-13), 7.28-7.44 (m, 5H, H_{Ar}).

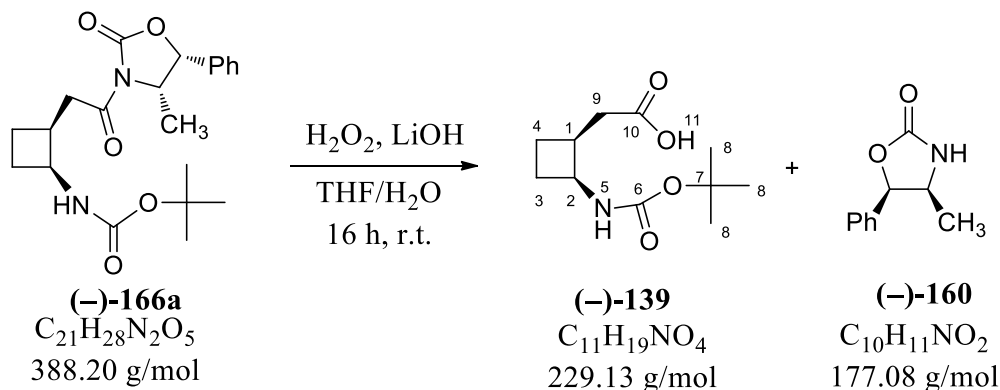
¹³C NMR (62.8 MHz, CDCl₃): 14.4 (C-12), 21.2 (C-4), 27.6 (C-3), 28.3 (C-8), 35.2 (C-1), 36.5 (C-9), 46.8 (C-2), 54.8 (C-11), 79.0 (C-13), 79.2 (C-7), 125.6 (2C_{Ar}), 128.6 (2C_{Ar}, C-17), 133.2 (C-14), 153.2 (C-18), 155.1 (C-6), 171.8 (C-10).

MP: 100 °C.

HR-MS: *m/z* calcd for [C₂₁H₂₈N₂O₅+Na]⁺ 411.1890 ; found 411.1871 (4.7 ppm).

[α]_D²⁵ (C = 1,02; CHCl₃): 22.

***Cis*-2-[(1*S*,2*S*)-2-[[*tert*-butoxy]carbonyl]amino]cyclobutyl]acetic acid (–)-139**



To a solution of (–)-**166a** (0.266 g, 0.69 mmol) in THF/H₂O (17 mL, 1:1) were added H₂O₂ (400 μL, 4.12 mmol, 6 eq) and LiOH (0.082 g, 3.43 mmol, 5 eq). The mixture was stirred at room temperature within 16 h. A solution of 1 M Na₂SO₃ (5 mL) and a saturated solution of NaHCO₃ (5 mL) were added successively. THF was evaporated, and then aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (4 × 4 mL). Organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated to afford oxazolidinone (0.120 g, 0.68 mmol). Aqueous extract was then cooled to 0 °C, acidified with concentrated HCl, and extracted with CH₂Cl₂ (4 × 4 mL). Organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated to afford compound (–)-**139** as white solid (0.151 g, 0.66 mmol).

Yield: 96 %.

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) : δ = 1.42 (s, 3H, H-8), 1.53-1.59 (m, 1H, H-4), 1.87-2.01 (m, 1H, H-3), 1.87-2.05 (m, 1H, H-4), 2.30 (m, 1H, H-3), 2.42 (dd, *J* = 15.9 Hz, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-9), 2.54 (dd, *J* = 15.8 Hz, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-9), 2.90 (m, 1H, H-1), 4.04-4.30 (m, 1H, H-2), 4.91 (bs, 0.7H, H-5), 6.27 (bs, 0.3H, H-5), 11.77 (bs, 1H, H-11).

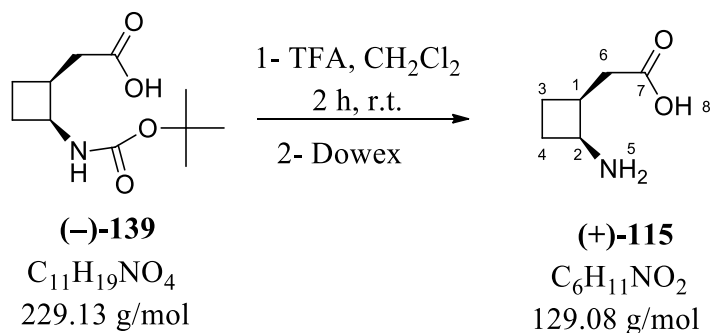
¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃): δ = 21.3 (C-4), 27.2 (C-3), 28.3 (C-8), 34.2 (C-9), 36.8 (C-1), 47.0 (C-2), 79.4 (C-7), 155.2 (C-6), 177.8 (C-10).

MP: 127 °C.

[α]_D²⁷ (C = 0.99; CHCl₃): -69.

HR-MS: m/z calcd for [C₁₁H₁₉NO₄+Na]⁺ 252.1206 ; found 252.1203 (1.3 ppm).

Cis*-2-[(1*S*,2*S*)-2-Aminocyclobutyl]acetic acid (+)-**115*



A solution of **(-)-139** (0.100 g, 0.44 mmol) in CH_2Cl_2 (12 mL) was cooled at 0 °C, then TFA (670 μ L, 17.48 mmol 20 eq) was added. The solution was stirred within 2 h at room temperature. The solution was deposited on a cation-exchange column (Dowex 50W \times 8, H^+ , 50-100 mesh). The column was washed with water until the eluent was neutral, then the product was eluted with 3 M NH_4Cl solution. After elution and evaporation of appropriate fractions, pure amino acid **(+)-115** was obtained as a white solid (0.047 g, 0.36 mmol).

Yield: 83 %.

TLC Rf: (EtOH / H_2O 8:2): 0.57.

1H NMR (250 MHz, D_2O): 1.59-1.70 (m, 1H, H-4), 1.95-2.10 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 2.20-2.29 (m, 1H, H-3), 2.31 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 14.8$ Hz, 1H, H-6), 2.40 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 14.8$ Hz, 1H, H-6), 2.75-2.89 (m, 1H, H-1), 3.83 (q, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-2).

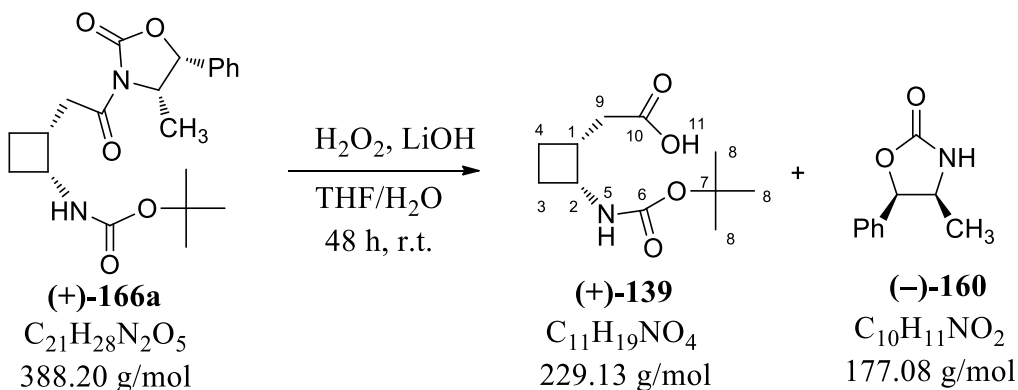
^{13}C NMR (62.8 MHz, D_2O): 21.6 (C-4), 23.8 (C-3), 34.4 (C-1), 37.2 (C-6), 47.5 (C-2), 180.8 (C-7).

MP: 195 °C.

$[\alpha]_D^{25}$ (C = 0.98; H_2O): 8.

HR-MS: m/z calcd for $[C_6H_{11}NO_2+H]^+$ 130.0863 ; found 130.0863 (-0.2 ppm).

Cis*-2-[(1*R*,2*R*)-2-[[*tert*-butoxy]carbonyl]amino]cyclobutyl]acetic acid (+)-**139*



To a solution of (+)-**166b** (0.253 g, 0.65 mmol) in THF/H₂O (16 mL, 1:1) were added H₂O₂ (570 μ L, 5.86 mmol, 9 eq) and LiOH (0.109 g, 4.56 mmol, 7 eq). The mixture was stirred at room temperature within 72 h. A solution of 1 M Na₂SO₃ (5 mL) and a saturated solution of NaHCO₃ (5 mL) were added successively. THF was evaporated, and then aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (4 \times 4 mL). Organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated to afford oxazolidinone (0.113 g, 0.64 mmol). Aqueous extract was then cooled to 0 $^{\circ}$ C, acidified with concentrated HCl, then extracted with CH₂Cl₂ (4 \times 4 mL). Organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated to afford compound (+)-**139** as white solid (0.149 g, 0.65 mmol).

Yield: 100 %.

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) : δ = 1.44 (s, 3H, H-8), 1.53-1.61 (m, 1H, H-4), 1.85-2.07 (m, 1H, H-3), 1.87-2.05 (m, 1H, H-4), 2.33 (m, 1H, H-3), 2.41 (dd, J = 15.8 Hz, J = 9.0 Hz, 1H, H-9), 2.54 (dd, J = 15.8 Hz, J = 6.8 Hz, 1H, H-9), 2.91 (m, 1H, H-1), 4.06-4.36 (m, 1H, H-2), 4.83 (bs, 0.7H, H-5), 6.00 (bs, 0.3H, H-5), 11.70 (bs, 1H, H-11).

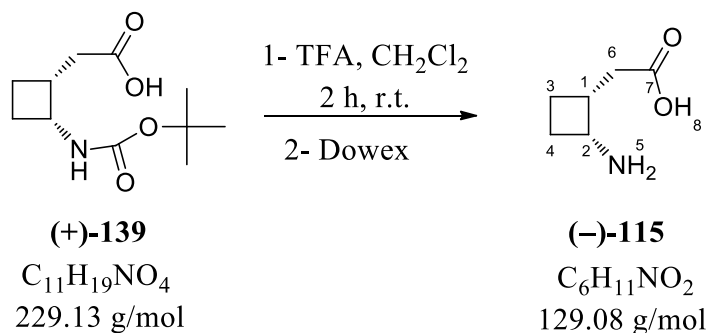
¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃): δ = 21.3 (C-4), 27.2 (C-3), 28.3 (C-8), 34.2 (C-9), 36.8 (C-1), 47.0 (C-2), 79.4 (C-7), 155.2 (C-6), 177.8 (C-10).

MP: 127 $^{\circ}$ C.

$[\alpha]_D^{27}$ (C = 0.96; CHCl₃): 68.

HR-MS: m/z calcd for [C₁₁H₁₉NO₄+Na]⁺ 252.1206 ; found 252.1203 (1.3 ppm).

Cis*-2-[(1*R*,2*R*)-2-aminocyclobutyl]acetic acid (–)-**115*



A solution of (+)-**139** (0.150 g, 0.65 mmol) in CH_2Cl_2 (12 mL) was cooled at 0 °C, then TFA (997 μ L, 13.02 mmol 20 eq) was added. The solution was stirred within 2 h at room temperature. The solution was deposited on a cation-exchange column (Dowex 50W \times 8, H^+ , 50-100 mesh). The column was washed with water until the eluent was neutral, then the product was eluted with 3 M NH_4Cl solution. After elution and evaporation of appropriate fractions, pure amino acid (–)-**115** was obtained as a white solid (0.081 g, 0.62 mmol).

Yield: 96 %.

TLC Rf: (EtOH / H_2O 8:2): 0.57.

1H NMR (250 MHz, D_2O): 1.59-1.70 (m, 1H, H-4), 1.95-2.10 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 2.20-2.29 (m, 1H, H-3), 2.31 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 14.8$ Hz, 1H, H-6), 2.40 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 14.8$ Hz, 1H, H-6), 2.75-2.89 (m, 1H, H-1), 3.83 (q, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-2).

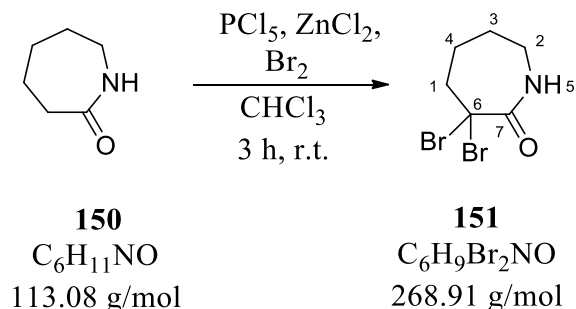
^{13}C NMR (62.8 MHz, D_2O): 21.6 (C-4), 23.8 (C-3), 34.4 (C-1), 37.2 (C-6), 47.5 (C-2), 180.8 (C-7).

MP: 195 °C.

$[\alpha]_D^{27}$ (C = 0.98; H_2O): -8.

HR-MS: m/z calcd for $[C_6H_{11}NO_2+H]^+$ 130.0863 ; found 130.0864 (-0.9 ppm).

3,3-Dibromoazepan-2-one **151**



A solution of caprolactam **150** (10.000 g, 88.50 mmol) was dissolved in chloroform (200 mL) then cooled to 4 °C in an ice bath. Phosphorus pentachloride (36.860 g, 177.00 mmol, 2 eq) was then added in small portions over a period of 30 minutes. Dry zinc chloride (0.400 g, 2.94 mmol) was added followed by bromine (9 mL, 177.00 mmol, 2 eq). During the addition of bromine which took 30 minutes, the reaction mixture was allowed to reach room temperature. The reaction was stirred for 3 h. Ice-water mixture (200 mL) was added to the reaction. The chloroform layer was washed with water (3 × 100 mL) then treated with a 0.5 M solution of sodium bisulfite (3 × 100 mL), dried over sodium sulfate, and concentrated under reduced pressure. The crude yellow solid was washed with water followed by petroleum ether and recrystallized from benzene to give white crystals (15.870 g, 0.06 mmol).¹⁷²

Yield: 73 %.

TLC Rf (EtOAc / c-hexane 70:30): 0.45.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.67-1.75 (m, 2H, H-4), 1.95-2.03 (m, 2H, H-3), 2.73-2.77 (m, 2H, H-2), 3.36-3.42 (m, 2H, H-1), 6.52 (bs, 1H, H-5).

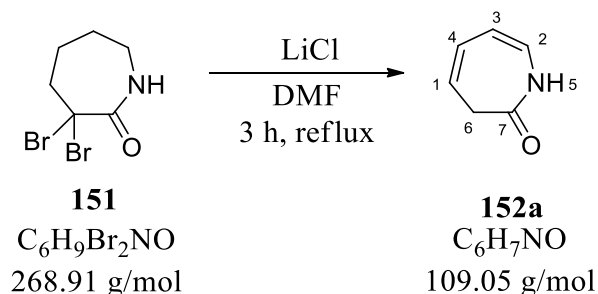
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 28.3 (C-4), 28.4 (C-3), 42.5 (C-2), 46.0 (C-1), 69.3 (C-6), 168.3 (C-7).

MP: 162 °C.

IR (solid): (C-Br) 769, (C-C) 1326, (C=O) 1665, (C-H) 2940, (NH) 3090, (NH) 3207 cm⁻¹.

HR-MS: m/z calcd for [C₆H₉Br₂NO+Na]⁺ 291.8943; found 293.8918 (2.5 ppm).

2,3-Dihydro-1*H*-azepin-2-one **152a**



Compound **151** (20,460 g, 76.09 mmol) was dissolved in dry DMF (60 mL) and dry LiCl (9.665 g, 228.26 mmol) was added. The reaction mixture was heated to reflux under argon atmosphere for 3 h. Solvent was evaporated under reduced pressure. 120 mL of water was added, and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (4×80 mL). The organic layer was dried with MgSO_4 , filtered and concentrated to afford yellow oil that was purified by flash chromatography using a gradient of EtOAc/c-hexane as eluent from 70:30 to 100:0. Compound **152a** was obtained as yellow solid (4.894 g, 44.88 mmol).¹²²

Yield: 59 %.

TLC R_f (Et_2O): 0.56.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 2.92 (d, J = 7.0 Hz, 2H, H-6), 5.65 (dt, J = 9.1 Hz, J = 6.9 Hz, 1H, H-1), 5.86 (dd, J = 5.1 Hz, J = 8.9 Hz, 1H, H-3), 6.17-6.23 (m, 1H, H-4, 1H, H-2), 7.87 (bs, 1H, H-5).

UV/Vis (CH_3CN): λ_{max} = 259 (ϵ = $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

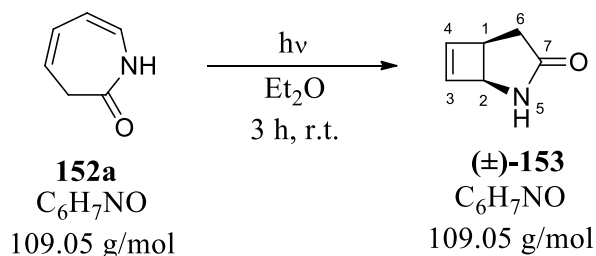
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 37.2 (C-6), 114.2 (C-3), 121.1 (C-1), 125.4 (C-2), 127.6 (C-4), 168.7 (C-7).

MP: 45 °C.

IR (solid): (C-C) 1334, (C=O) 1592, (C=C, C=O) 1635 and 1650, (C-H) 2943, (NH) 3083, (NH) 3193 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}+\text{H}]^+$ 110.0600 ; found 110.0604 (-3.3 ppm).

(±)-Cis-2-Azabicyclo[3.2.0]hept-6-en-3-one (±)-153



A solution of the lactam **152a** (0.450 g, 4.13 mmol) in diethyl ether (500 mL) was degassed with an argon stream in a cylindrical water-cooled reactor during 15 min, and then irradiated for 3 h with a 400 W medium-pressure mercury lamp fitted with a Quartz filter, while the reactor was cooled with an external ice bath. The solvent was evaporated under reduced pressure to afford the crude product (±)-**153** (0.450 g, 4.13 mmol) that was used in the next reaction without any purification.

TLC R_f (Et₂O): 0.11

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.27 (dd, J = 17.9 Hz, J = 3.4 Hz, 1H, H-6), 2.46 (dd, J = 17.9 Hz, J = 10.2 Hz, 1H, H-6), 3.56 (dt, J = 10.2 Hz, J = 3.4 Hz, 1H, H-1), 4.43-4.44 (m, 1H, H-2), 6.30-6.33 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 7.05 (bs, 1H, H-5).

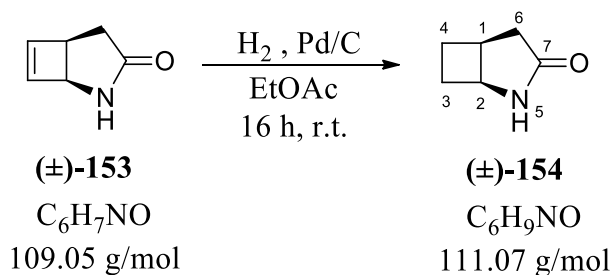
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 33.7 (C-1), 41.4 (C-2), 57.9 (C-6), 142.3, 142.5 (C-3, C-4), 178.7 (C-7).

MP: 75 °C.

IR (solid): (C-C) 1250, (C-N) 1302, (C=C) 1645, (C=O) 1676, (C-H), 2961, (NH) 3266 cm⁻¹

HR-MS: m/z calcd for [C₆H₇NO+H]⁺ 110.600 ; found 110.0599 (1.2 ppm).

(±)-Cis-2-Azabicyclo[3.2.0]heptan-3-one(±)-154



To a solution of (±)-**153** (0.450 g, 4.13 mmol) in EtOAc (30 mL), was added 10 % Palladium on carbon catalyst (0.130 g). The solution was deoxygenated under reduced pressure then purged with an hydrogen atmosphere. After 16 h, the mixture was filtered on celite. Solvent was evaporated to afford the crude product (±)-**154** (0.439 g, 3.95 mmol) that was used in the next reaction without any purification. The spectral data were identical to those reported previously.¹²²

TLC Rf (Et₂O): 0.11

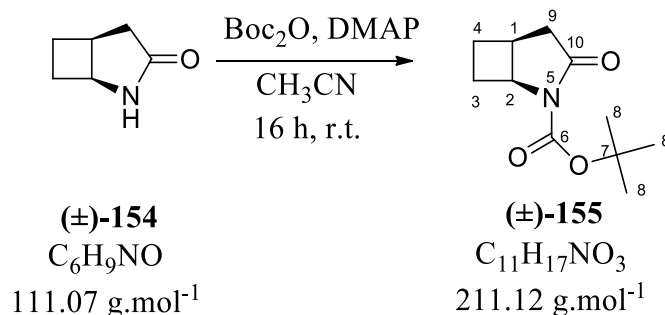
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.87 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 2.17 (d, J = 17.8 Hz, 1H, H-6), 2.23-2.33 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 2.47 (dd, J = 9.1 Hz, J = 17.8 Hz, 1H, H-6), 3.05-3.09 (m, 1H, H-1), 4.04-4.07 (m, 1H, H-2), 7.20 (bs, 1H, H-5).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 25.5 (C-4), 26.3 (C-3), 33.1 (C-1), 37.1 (C-6), 54.2 (C-2), 179.3 (C-7).

IR (solid): (C-C) 1287, (C-N) 1310, (C=O) 1677, (C-H), 2939, (NH) 3237 cm⁻¹

HR-MS: m/z calcd for [C₆H₉NO+H]⁺ 112.0757; found 112.0761 (-3.5 ppm).

(±)-Cis-tert-butyl 3-oxo-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylate(±)-155



To a solution of (±)-**154** (0.439 g, 3.95 mmol) in acetonitrile (40 mL) were added DMAP (0.048 g, 0.40 mmol, 0.1 eq) and Boc_2O (1.729 g, 7.9 mmol, 2 eq) at 0 °C under a stream of argon. The solution was stirred at 0 °C for 5 min, and then at room temperature for 16 hr. The solvent was evaporated, and the crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of Et₂O/EP as eluent from 05:95 to 100:0. Compound (±)-**155** (0.834 g, 3.95 mmol) was isolated as a white solid.

Yield: 95 % (three steps from compound **152a**).

TLC Rf (EtOAc): 0.75.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.51 (s, 9H, H-8), 1.82-1.92 (m, 1H, H-4), 1.98-2.05 (m, 1H, H-3), 2.25-2.35 (m, 1H, H-4), 2.43 (dd, J = 1.8 Hz, J = 18.2 Hz, 1H, H-9); 2.43-2.53 (m, 1H, H-3), 2.68 (dd, J = 9.1 Hz, J = 17.7 Hz, 1H, H-9), 2.93-3.01 (m, 1H, H-1), 4.41-4.45 (m, 1H, H-2).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 25.1 (C-4), 27.8 (C-3), 28.0 (C-8), 28.4 (C-1), 39.5 (C-9), 58.0 (C-2), 82.5 (C-7), 149.7 (C-6), 175.1 (C-10).

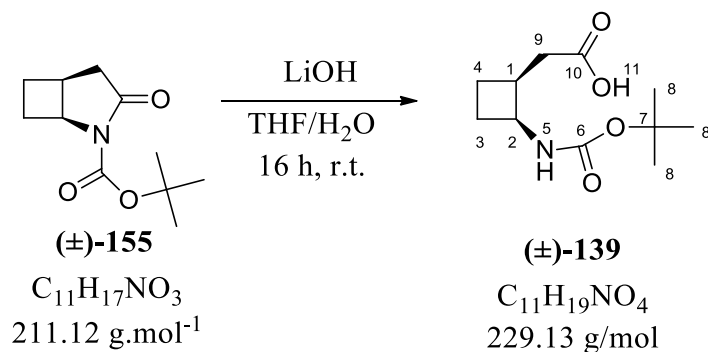
MP: 51 °C.

IR: (C-C) 1140, (C-N) 1164, (C-O) 1295, (C=O) 1766, (C-H), 2982.

HR-MS: m/z calcd for $[C_{11}H_{17}NO_3+Na]^+$ 234.1101; found 234.1096 (2.2 ppm).

Anal: calcd for $C_{11}H_{17}NO_3$: C, 62.54; H, 8.11; N, 6.63; found: C, 62.51; H, 8.23; N, 6.65.

(±)-Cis-2-(2-[[*tert*-butoxy)carbonyl]amino]cyclobutyl)acetic acid (±)-139



A solution of (±)-**155** (0.200 g, 0.95 mmol) in THF (15 mL) and water (15 mL) was stirred with LiOH (0.228 g, 9.48 mmol, 10 eq) at room temperature for 16 h. The THF was then evaporated under reduced pressure. The aqueous layer was acidified with an aqueous solution of HCl (0.5 M) until pH = 1, and saturated with solid NaCl. The aqueous layer was extracted with EtOAc (5×30 mL), and the combined organic extracts were dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 50:50 to 100:0. Compound (±)-**139** was isolated as a white solid (0.195 g, 0.72 mmol).

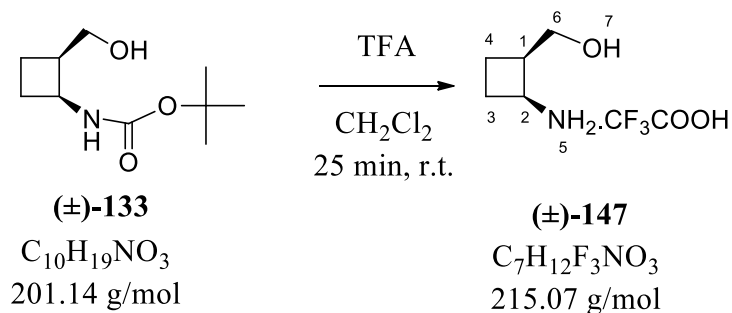
Yield: 90 %.

MP: 118 °C.

Spectral data page 140.

II. Various Tests

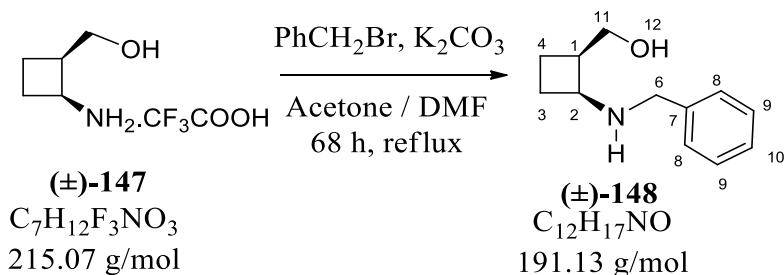
(±)-Cis-(2-Aminocyclobutyl)methanol trifluoroacetate(±)-147



To a solution of compound (±)-**133** (0.410 g, 2.04 mmol) in dry CH_2Cl_2 cooled at 0 °C in an ice bath was added dropwise TFA (5.2 mL, 68.31 mmol, 33 eq). The reaction mixture was stirred for 25 min at room temperature. Solvent and excess TFA were evaporated under reduced pressure to afford product (±)-**147** as a colorless oil (0.662 g). The product was directly used in the next reaction without purification.

1H NMR (360 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.93-2.52 (m, 2H, H-3, 2H, H-4), 2.85 (bs, 1H, H-7), 3.02-3.15 (m, 1H, H-1), 4.02-4.05 (m, 1H, H-2), 4.55-4.76 (m, 2H, H-6, 1H, H-5), 7.72 (bs, 1H, H-5), 8.02 (bs, 1H, CF_3COOH).

[2-(Benzylamino)cyclobutyl]methanol (±)-148



To a solution of compound (±)-**147** (0.217 g, 1.01 mmol) in acetone / DMF (4 mL 1:1), were added bromobenzene (254 μL , 2.12 mmol, 2.1 eq), and K_2CO_3 (0.553 g, 4.04 mmol, 4 eq). The reaction mixture was heated to reflux for 68 h. The mixture was filtered over celite, washed with CH_2Cl_2 , and concentrated in a vacuum. The crude product was purified by flash chromatography using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 10:90 to 100:0, to afford yellow oil (0.068 g, 0.36 mmol).

Yield: 36 %.

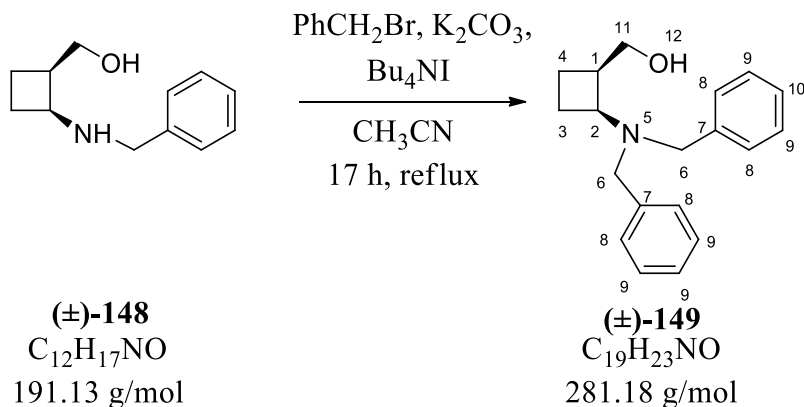
TLC Rf (EtOAc): 0.33.

^1H NMR (360 MHz, CDCl_3): δ = 1.40-1.50 (m, 1H, H-4), 1.76-1.89 (m, 1H, H-4), 2.00-2.19 (m, 2H, H-3), 2.67-2.73 (m, 1H, H-1), 3.58-3.69 (m, 1H, H-2, 1H, H11), 3.85-4.07 (m, 1H, H-11, 1H, H-6), 6.98 (bs, 1H, H5, 1H, H-12), 7.31-7.47 (m, 2H, H-8, 2H, H-9, 1H, H-10).

^{13}C NMR (90 MHz, CDCl_3): δ = 17.51 (C-4), 24.58 (C-3), 38.67 (C-1), 50.14 (C-6), 53.00 (C-2), 61.10 (C-11), 128.91 (C-8), 129.19 (C-10), 129.95 (C-9), 131.33 (C-7).

HR-MS: m/z calcd for $[\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}+\text{H}]^+$ 192.1383 ; found 192.1379 (+ 2.0 ppm).

[2-(dibenzylamino)cyclobutyl]methanol (±)-149



A solution of (±)-**148** (0.068 g, 0.36 mmol), bromobenzene (43 μL , 0.36 mmol, 1 eq), K_2CO_3 (0.099 g, 0.72 mmol, 2 eq), and Bu_4NI (0.026 g, 0.11 mmol, 0.3 eq) in acetonitrile (5 mL) was stirred under argon at reflux for 17 h. Acetonitrile was concentrated under reduced pressure, and the residue was dissolved in water (5 mL) and EtOAc (5 mL). Aqueous layer was extracted with EtOAc (4×5 mL) and the combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 10:90 to 100:0 to afford yellow oil (0.040 g, 0.14 mmol).

Yield: 39 %.

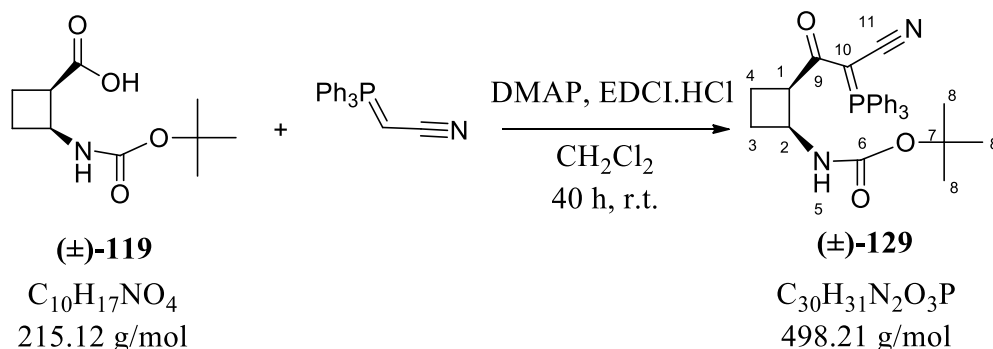
TLC R_f (EtOAc / EP 1:1): 0.82.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 1.77-2.23 (m, 2H, H-4, 2H, H-3), 2.49-2.53 (m, 1H, H-1), 3.33-3.52 (m, 1H, H-2, 2H, H-5), 3.75 (d, J = 15 Hz, 2H, H-5), 3.84 (dd, J = 15 Hz, 1H, H-10), 4.17 (dd, J = 5 Hz, 1H, H-10), 7.28-7.42 (m, 4H, H-7, 4H, H-8, 2H, H-9).

^{13}C NMR (62.8 MHz, CDCl_3): δ = 18.80 (C-4), 27.63 (C-3), 39.07 (C-1), 54.45 (C-5), 59.31 (C-2), 64.50 (C-10), 127.09 (2C, C-9), 128.25 (4C, C-8), 129.24 (4C, C-7), 137.34 (2C, C-6).

HR-MS: m/z calcd for $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}+\text{H}]^+$ 282.1852 ; found 282.1844 (+ 3.1 ppm).

***Tert*-butyl N-{2-[2-cyano-2-(triphenylphosphoranylidene)acetyl]cyclobutyl}carbamate (±)-129**



To a solution of (±)-**119** (0.430 g, 2.00 mmol) and ylide (0.753 g, 2.50 mmol, 1.25 eq) in CH_2Cl_2 (30 mL), were added EDCI.HCl (0.479 g, 2.50 mmol, 1.25 eq) and DMAP (0.024 g, 0.40 mmol, 0.2 eq) at 0° C. The temperature was raised to room temperature, and the reaction mixture was stirred for 40 h under argon atmosphere. The resulting mixture was washed with an aqueous solution of HCl (0.5 N, 3 × 50 mL), and with water. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 30:70 to 100:0 to afford a white solid (0.687 g, 1.38 mmol).

Yield: 69 %.

TLC Rf (EtOAc / EP 70:30): 0.54.

1H NMR (360 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.38 (s, 9H, H-8), 1.85-1.95 (m, 2H, H-3, H-4), 2.00-2.10 (m, 1H, H-3), 2.15-2.25 (m, 1H, H-4), 4.10-4.16 (m, 1H, H-1), 4.37-4.47 (m, 1H, H-2), 5.72-5.84 (bs, 1H, H-5), 7.44-7.59 (m, 15H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (90 MHz, $CDCl_3$): δ = 27.3 (C-3), 28.4 (3C-8), 30.3 (J = 3.2 Hz, C-4), 47.1 (J = 6.9 Hz, C-2), 49.6 (J = 15.5 Hz, C-1), 78.8 (C-7), 121.6 (J = 16.4 Hz, C-11), 123.0 (J = 93 Hz, C-10), 128.8-129.1 (5 C_{Ar}), 132.8-133.4 (10 C_{Ar}), 197.7 (J = 24.2 Hz, C-9).

MP: 175 °C.

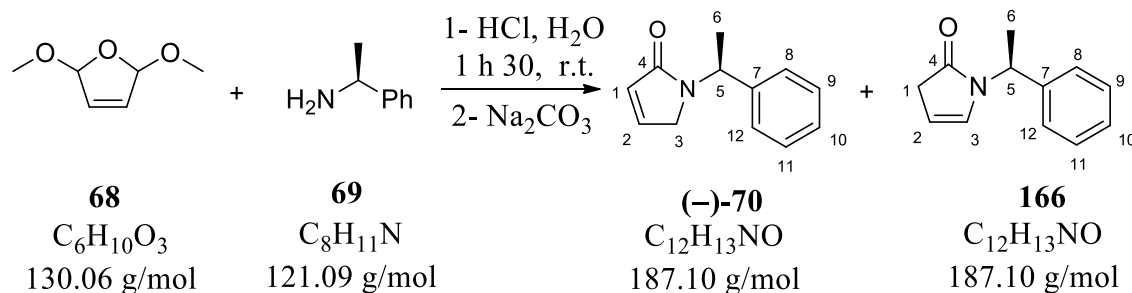
IR (solid): (C-C, C-N) 1173, (C-O) 1262, (C=P) 1376, (C=O, C=C) 1570 and 1583, (C=O) 1699, (C≡N) 2175, (C-H) 2974, (N-H) 3137 and 3247 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[C_{30}H_{31}N_2O_3P + Na]^+$ 521.1965 ; found 521.1954 (+ 2.0 ppm).

Anal: calcd for $C_{30}H_{31}N_2O_3P$: C, 72.27; H, 6.27; N, 5.62; found: C, 71.89; H, 6.28; N, 5.53.

III.Synthesis of
IV.*cis*- γ -amino-2.3-cyclobutanic acid
V. *cis*-^{2.3}CB-GABA

1-[(1*S*)-1-Phenylethyl]-2,5-dihydro-1H-pyrrol-2-one (–)-170 and 1-[(1*S*)-1-phenylethyl]-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-one 166



Compound **68** (3.00 mL, 24.79 mmol) was added to (*1S*)-phenylethylamine **69** (3.20 mL, 24.79 mmol), then 80 mL of water and 30 mL of an aqueous solution of HCl (10 %) were added successively. The mixture was stirred at room temperature (22 °C) for 1 h 30. The solution turned into orange. The reaction was quenched by addition of Na₂CO₃ powder so we can obtain a basic medium (12 < pH < 14). The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (6 × 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtrated and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using Et₂O/EP (60:40) as eluent to afford (–)-**70** (2.720 g, 14.55 mmol) and **166** (0.467 g, 2.50 mmol) as red oil. The spectral data of (–)-**70** were identical to those reported previously.¹⁷³

Yield: 69 %

1-[(1*S*)-1-Phenylethyl]-2,5-dihydro-1H-pyrrol-2-one (–)-70

Yield: 59 %.

TLC R_f (Et₂O): 0.36.

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ = 1.61 (d, *J* = 7 Hz, 3H, H-6), 3.63 (dt, *J* = 2 Hz, *J* = 24 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-3), 3.94 (dt, *J* = 2 Hz, *J* = 24 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-3), 5.59 (q, *J* = 8 Hz, 1H, H-5), 6.19 (dt, *J* = 2 Hz, *J* = 7 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-1), 7.04 (dt, *J* = 2 Hz, *J* = 7 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-2), 7.25–7.39 (m, 5H, H_{Ar}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 17.7 (C-6), 48.6 (C-3), 48.9 (C-5), 126.9 (C-8, C-12), 127.4 (C-10), 127.9 (C-1), 128.6 (C-9, C-11), 140.9 (C-7), 142.7 (C-2); 171.0 (C-4).

[α]_D²⁴ (C = 1.01; CHCl₃): -201.

UV/Vis (CH₃CN): λ (ε M⁻¹, cm⁻¹) = 240 (2914).

1-[(1*S*)-1-Phenylethyl]-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol-2-one 166

Yield: 10 %.

TLC R_f (Et₂O): 0.76.

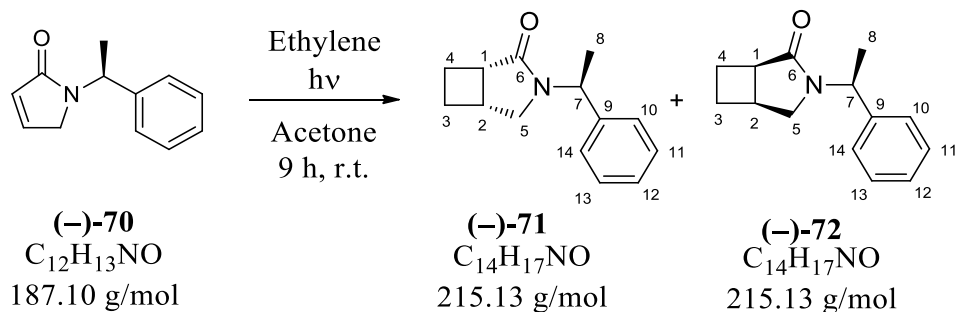
¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ = 1.61 (d, J = 6 Hz, 3H, H-6), 3.12 (d, J = 2 Hz, 2H, H-1), 5.27 (q, J = 2 Hz, 1H, H-5), 5.45 (q, J = 7 Hz, 1H, H-2), 6.37 (d, J = 1 Hz, 1H, H-3), 7.28-7.38 (m, 5H, H_{Ar}).

¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃): δ = 18.8 (C-6), 37.7 (C-1), 49.3 (C-5), 104.4 (C-2), 126.6 (C-8, C-12), 127.5 (C-10), 128.6 (C-9, C-11), 130.2 (C-3), 140.9 (C-7), 176.4 (C-4).

$[\alpha]_D^{23}$ (C = 1.01; CHCl₃): -162.

UV/Vis (CH₃CN): λ (ϵ M⁻¹, cm⁻¹) = 244 (944).

(1*S*, 5*R*) and (1*R*,5*S*)-3-[(1*S*)-1-Phenylethyl]-3-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-one (–)-71 and (–)-72



A solution of lactam (–)-70 (0.780 g, 4.17 mmol) in acetone (1 L) was degassed with an argon stream during 30 min, saturated with an ethylene stream during 30 min, and irradiated for 9 h with a 400 W medium-pressure mercury lamp fitted with a Pyrex filter, while ethylene was bubbled through. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography (ISCO - silica ultra-Flash) using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 40:60 to 100:0 to afford two diastereoisomers: (–)-71 (0.332 g, 1.54 mmol) and (–)-72 (0.269 g, 1.25 mmol). The spectral data were identical to those reported previously.⁴⁹

(1*S*,5*R*)-3-[(1*S*)-1-Phenylethyl]-3-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-one (–)-71

Yield: 37 %.

TLC R_f (EtOAc/EP 1:1): 0.35.

1H NMR (360 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.55 (d, J = 7 Hz, 3H, H-8), 1.62-1.71 (m, 1H, H-3), 2.04-2.25 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 2.39-2.51 (m, 1H, H-4), 2.74 (dd, J = 7 Hz, J = 10 Hz, 1H, H-2), 2.88 (m, J = 5 Hz, 1H, H-1), 3.03-3.10 (m, 1H, H-5), 3.43 (dd, J = 10 Hz, J = 7 Hz, 1H, H-5), 5.57 (q, J = 7 Hz, 1H, H-7), 7.2 à 7.4 (m, 5H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (90 MHz, $CDCl_3$): δ = 15.5 (C-8), 24.3 (C-2), 25.9 (C-4), 29.9 (C-3), 41.9 (C-1), 48.4 (C-5), 48.7 (C-7), 126.9 (C-10, C-14), 127.3 (C-12), 128.4 (C-11, C-13) ; 140.4 (C-9), 176.8 (C-6).

$[\alpha]_D^{23}$ (C = 0.97; $CHCl_3$): -123.

(1*R*,5*S*)-3-[(1*S*)-1-Phenylethyl]-3-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-one (–)-72

Yield: 30 %.

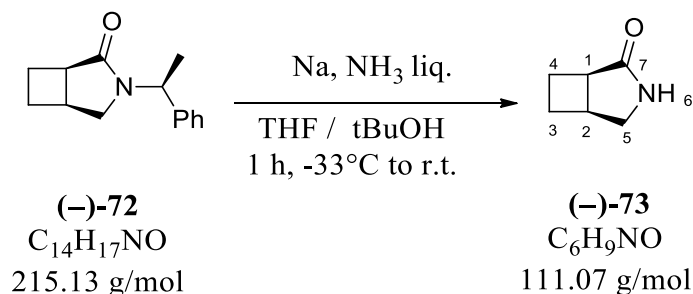
TLC R_f (EtOAc/EP 1:1): 0.55.

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ = 1.59 (d, J = 7 Hz, 3H, H-8), 1.85-1.96 (m, 1H, H-3), 2.08-2.20 (m, 1H, H-4), 2.27-2.38 (m, 1H, H-3), 2.40-2.53 (m, 1H, H-4), 2.80-2.89 (m, 1H, H-2), 2.95-3.05 (m, 2H, H-5, 1H, H-1), 5.57 (q, J = 7 Hz, 1H, H-7), 7.2-7.4 (m, 5H, H_{Ar}).

¹³C NMR (62.8 MHz, CDCl₃): δ = 16.6 (C-8), 24.2 (C-2), 26.5 (C-4), 29.9 (C-3), 41.9 (C-1), 48.9 (C-5), 49.0 (C-7), 127.2 (C-10, C-14), 127.4 (C-12), 128.4 (C-11, C-13), 139.8 (C-9), 176.7 (C-6).

$[\alpha]_D^{14}$ (C = 1.00; CHCl₃): -191.

(1*R*,5*S*)-3-Azabicyclo[3.2.0]heptan-2-one (–)-73



Sodium pellets (0.861 g, 37.45 mmol) were added under a stream of argon to liquid ammonia (125 mL) at -33 °C. To the resulting blue solution was added compound (–)-72 (1.145 g, 5.35 mmol) in solution in dry THF (22 mL) and dry tBuOH (1.15 mL). The mixture was stirred for 1 h. The reaction was quenched by addition of NH_4Cl powder until the disappearance of the blue color, and then allowed to warm to room temperature as the ammonia evaporated. Water (22 mL) was added to the concentrated residue, then an aqueous solution of HCl (1 M) was added slowly until pH = 1. The mixture was extracted with CH_2Cl_2 (6 × 40 mL), and combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated. The compound (–)-73 was used in the next reaction without any purification. The spectral data were identical to those reported previously.⁴⁹

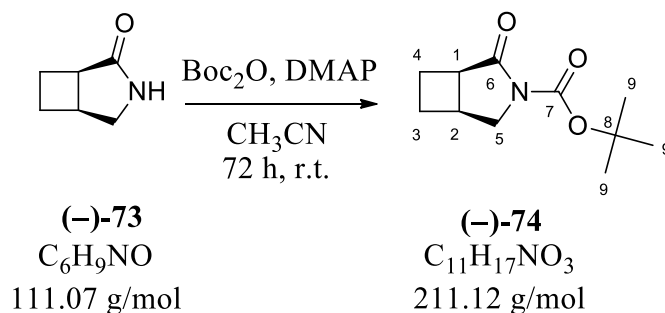
TLC R_f (EtOAc / EP 1:1): 0.25.

¹H NMR (360 MHz, CDCl_3): δ = 2.06-2.14 (m, 2H, H-3), 2.34-2.38 (m, 2H, H-4), 2.89-2.96 (m, 1H, H-2), 3.06-3.10 (m, 1H, H-1), 3.34 (d, J = 10 Hz, 1H, H-5), 3.52 (dd, J = 10 Hz, J = 7 Hz, 1H, H-5), 6.41 (bs, 1H, H-6).

¹³C NMR (62.8 MHz, CDCl_3): δ = 24.4 (C-2), 26.7 (C-4), 33.8 (C-3), 40.9 (C-1), 49.2 (C-5), 182.3 (C-7).

$[\alpha]_D^{23}$ (C = 0.5; CHCl_3): -58.

Tert*-butyl (1*R*,5*S*)-2-oxo-3-azabicyclo[3.2.0]heptane-3-carboxylate (–)-**74*



To a solution of (–)-**73** (0.485 g, 4.37 mmol) in acetonitrile (35 mL), were added DMAP (0.053 g, 0.44 mmol) and Boc_2O (1.908 g, 8.74 mmol) at 0 °C under a stream of argon. The solution was stirred at 0 °C for 5 min, and then at room temperature over night. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the crude product (–)-**74** was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of $\text{Et}_2\text{O}/\text{EP}$ as eluent from 5:95 to 100:0. The product (–)-**74** was isolated (0.493 g, 2.34 mmol). The spectral data were identical to those reported previously.

Yield: 53 %.

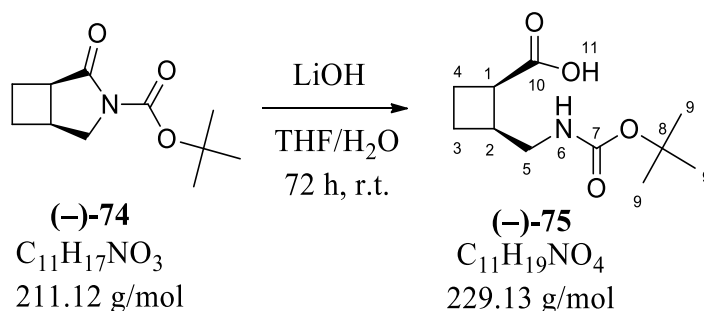
TLC Rf (EtOAc / EP 1:1): 0.63.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 1.56 (s, 9H, H-9), 1.97-2.07 (m, 1H, H-3), 2.13-2.21 (m, 1H, H-4), 2.313-2.33 (m, 1H, H-3), 2.45-2.56 (m, 1H, H-4), 2.91 (q, J = 7.4 Hz, 1H, H-2), 3.08-3.13 (m, 1H, H-1), 3.63 (d, J = 11.4 Hz, 1H, H-5), 3.80 (dd, J = 7.4 Hz, J = 11.3 Hz, 1H, H-5).

^{13}C NMR (62.8 MHz, CDCl_3): δ = 23.7 (C-4), 25.9 (C-3), 27.8 (3C-9), 28.6 (C-2), 42.5 (C-1), 52.7 (C-5), 82.6 (C-8), 150.5 (C-7), 177.5 (C-6).

$[\alpha]_D^{23}$ (C = 0.95, CHCl_3): -53.

(1*R*,2*S*)-2-([(Tert-butoxy)carbonyl]amino)methyl)cyclobutane-1-carboxylic acid (–)-75



LiOH powder (0.523 g, 21.73 mmol) was added to a solution of (–)-**74** (0.459 g, 2.17 mmol) in THF (25 mL) and water (25 mL). The mixture was stirred at room temperature for 16 h. The THF was then evaporated under reduced pressure. The aqueous layer was acidified at 0 °C with an aqueous solution of HCl (0.5 M) until pH = 1, and saturated with solid NaCl. The aqueous layer was extracted with EtOAc (5 × 50 mL), and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of EtOAc/EP as eluent from 50:50 to 100:0. The product (–)-**75** was isolated (0.439 g, 1.92 mmol) as a white solid. The spectral data were identical to those reported previously.⁵⁰

Yield: 88 %.

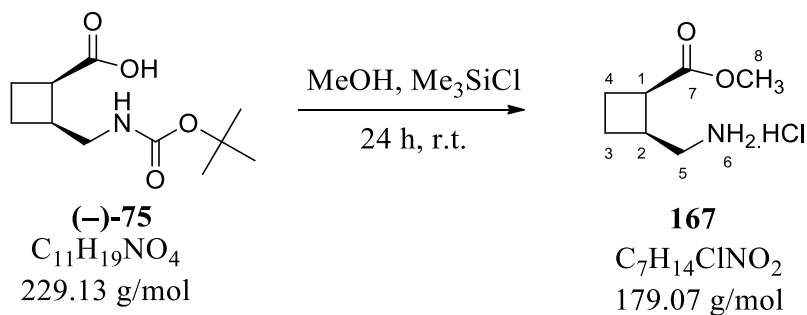
TLC R_f (EtOAc / EP 1:1): 0.38.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.44 (s, 9H, H-9), 1.66-1.86 (m, 1H, H-3), 2.00-2.18 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 2.22-2.38 (m, 1H, H-4), 2.74-2.92 (m, 1H, H-1), 3.16-3.42 (m, 2H, H-5, 1H, H-2), 4.91 (bs, 1H, H-6), 9.60 (bs, 1H, H-11).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 21.0 (C-3), 22.7 (C-4), 28.4 (C-9), 37.8 (C-1), 40.0 (C-2), 42.2 (C-5), 79.8 (C-8), 156.3 (C-7), 178.4 (C-10).

[α]_D²³ (C = 0.99; CHCl₃): -17.

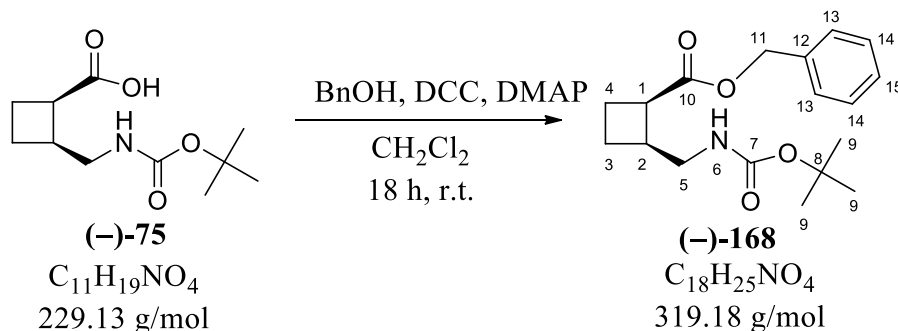
Methyl (1*R*,2*S*)-2-(aminomethyl)cyclobutane-1-carboxylate hydrochloride (–)-167.



Me_3SiCl (645 μL , 5.08 mmol) was added to a solution of (–)-**75** (0.289 g, 1.26 mmol) in distilled MeOH under a stream of argon. The reaction mixture was then stirred for 18 h at room temperature, and concentrated under reduced pressure to afford brown solid (0.237 g). The compound (–)-**167** was directly used in the next reaction without any purification.

1H NMR (250 MHz, D_2O): δ = 1.61-1.75 (m, 1H, H-3), 1.97-2.23 (m, 1H, H-3, 2H, H-4), 2.75-3.08 (m, 1H, H-2, 2H, H-5), 3.28-3.38 (m, H-1), 3.58 (s, 3H, H-8).

Benzyl (1*R*,2*S*)-2-([(*tert*-butoxy)carbonyl]amino)methyl)cyclobutane-1-carboxylate (–)-168



To a solution of the compound (–)-**75** (0.20 g, 0.87 mmol) in dry CH_2Cl_2 (4 mL) at 0 °C, were added DMAP (0.016 g, 0.09 mmol), DCC (0.216 g, 1.05 mmol) and BnOH (0.270 mL, 2.62 mmol). The stirring was maintained at 0 °C for 1 h then at room temperature for 18 h. The reaction mixture was filtered and the solvent was then concentrated under reduced pressure. AcOEt (20 mL) was added, and the crude product was washed successively with an aqueous solution of HCl (1M), $NaHCO_3$ (5%) and brine. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography (ISCO) using a gradient of AcOEt/EP as eluent from 0:100 to 100:0, to afford the compound (–)-**168** as a white solid (0.248 g, 0.78 mmol).

Yield: 98 %.

TLC Rf (EtOAc / EP 3:7): 0.69.

1H NMR (360 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.43 (s, 9H, H-9), 1.72-1.78 (m, 1H, H-3), 2.02-2.11 (m, 1H, H-3, 1H, H-4), 2.29-2.36 (m, 1H, H-4), 2.79-2.83 (m, 1H, H-1), 3.08-3.15 (m, 1H, H-5), 3.17-3.32 (m, 1H, H-2, 1H, H-5), 4.29 (bs, 0.1H, H-6), 4.70 (bs, 0.9H, H-6), 5.02-5.15 (m, 2H, H-11), 7.33-7.39 (m, 2H, H-13, 2H, H-14, H-15).

^{13}C NMR (90 MHz, $CDCl_3$): δ = 21.0 (C-3), 22.6 (C-4), 28.4 (C-9), 37.9 (C-1), 40.1 (C-2), 42.1 (C-5), 66.5 (C-11), 82.2 (C-8), 128.2-128.7 (C-12, 2C-13, 2C-14, C-15), 155.9 (C-7), 173.9 (C-10).

$[\alpha]_D^{22}$ (C = 0.99; $CHCl_3$): -7.

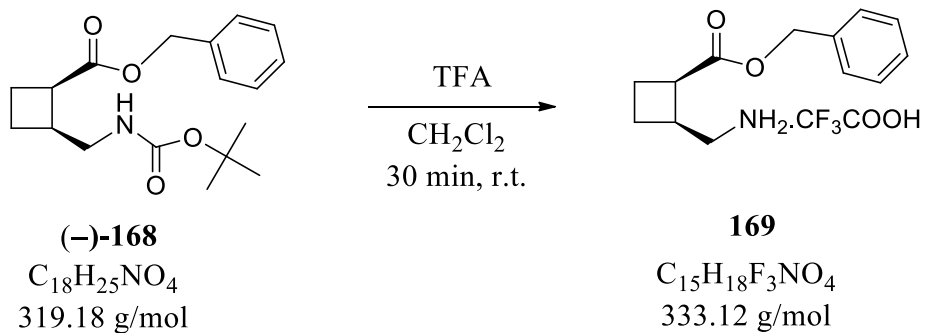
MP: 63 °C.

IR (solid): (C-C, C-N) 1175, (C-O) 1249, (C=C) 1517, (C=O) 1680, (C=O) 1725, (C-H) 2975, (N-H) 3349 and 3388 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[C_{18}H_{25}NO_4+Na]^+$ 342.1676 ; found 342.1667 (+ 2.7 ppm).

Anal: calcd for $C_{18}H_{25}NO_4$: C, 67.69; H, 7.89; N, 4.39; found: C, 68.11; H, 8.31; N, 4.18.

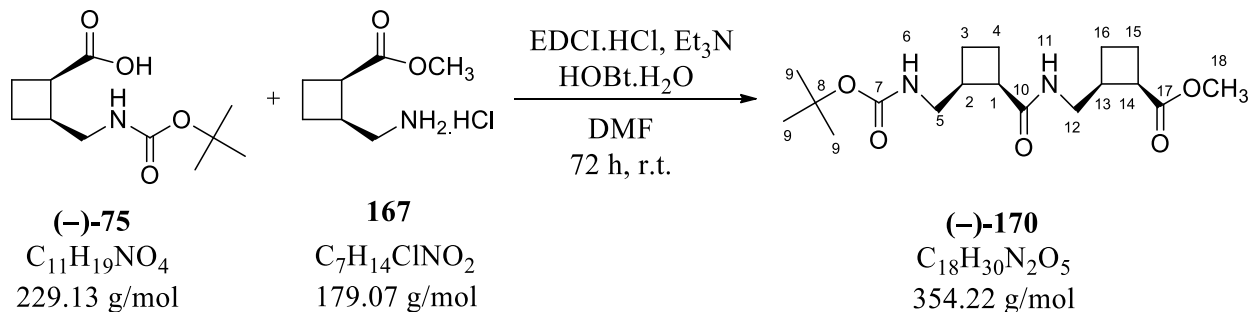
Benzyl (1*R*,2*S*)-2-(aminomethyl)cyclobutane-1-carboxylate trifluoroacetate **169**



A solution of **(-)-168** (0.421 g, 1.32 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) was cooled at 0 °C, and then TFA (3 mL, 39.48 mmol 30 eq) was added. The solution was stirred until completion of the deprotection within 30 min at room temperature. The excess of TFA was then evaporated under reduced pressure to afford colorless oil (0.521 g). The compound **169** was directly used in the next reaction without purification.

VI. Peptide Coupling

Methyl (1*R*,2*S*)-2-([(1*R*,2*S*)-2-([(*tert*-butoxy)carbonyl]amino) methyl)cyclobutyl] formamido)methyl)cyclobutane-1-carboxylate (–)-170****



Aminoester Hydrochloride salt **167** (0.237 g, 1.32 mmol) was dissolved in DMF (4 mL) and neutralized with Et_3N (365 μ L, 2.64 mmol, 2 eq) until basic medium. In another flask, EDCI.HCl (0.362 g, 0.51 mmol, 1.5 eq), HOBt.H₂O (0.230 g, 1.49 mmol, 1.13 eq) and Et_3N (175 μ L, 1.26 mmol, 1 eq) were added to a solution of (–)-**75** (0.290 g, 1.26 mmol) in DMF (12 mL) at room temperature. This mixture was stirred for 10 min, and the neutralized **167** was directly introduced in this solution and the stirring was maintained 72 h at room temperature. DMF was evaporated under reduced pressure. EtOAc (30 mL) was then added, and the remaining solution was washed with citric acid 5 % (15 mL), then with saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (15 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography using a gradient of EtOAc/EP (40:60 to 100:0) as eluent to afford (–)-**170** as a white solid (0.166 g, 0.47 mmol).

Yield: 37 %.

TLC Rf (EtOAc / EP 1:1): 0.4.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.45 (s, 9H, H-9), 1.70-1.77 (m, 1H, H-4, 1H, H-15), 2.06-2.14 (m, 1H, H-16, 1H, H-3, 1H, H-15, 1H, H-4), 2.25-2.33 (m, 1H, H-3, 1H, H-16), 2.77-2.83 (m, 1H, H-2, 1H, H-13), 3.10-3.12 (m, 1H, H-1), 3.21-3.31 (m, 1H, H-12, 2H, H-5, 1H, H-14), 3.52-3.58 (m, 1H, H-12), 3.73 (s, 3H, H-18), 5.31 (bs, 1H, H-6), 6.15 (bs, 1H, H-11).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 21.4 (C-16), 21.5 (C-3), 22.1 (C-15), 22.6 (C-4), 28.4 (C-9), 37.5 (C-13), 38.1 (C-2), 40.1 (C-14), 41.0 (C-12), 41.8 (C-1), 41.9 (C-5), 51.7 (C-18), 78.9 (C-8), 156.3 (C-7), 173.3 (C-10), 174.9 (C-17).

$[\alpha]_D^{25}$ (C = 1.02; CHCl₃): -29.

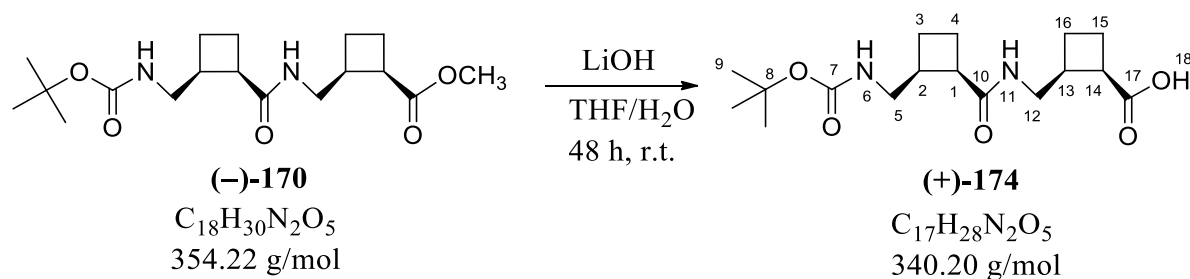
MP: 148 °C.

IR (Solution in CHCl₃, 20 mM): (N-H) 3444, (C-H) 2979, (C=O) 1707, (C=O) 1659 cm⁻¹.

HR- MS: m/z calcd for [C₁₈H₃₀N₂O₅+Na]⁺ 377.2047 ; found 377.2042 (+ 1.4 ppm).

Anal: calcd for C₁₈H₃₀N₂O₅: C, 61.0; H, 8.53; N, 7.90; found: C, 59.43; H, 8.27; N, 8.25.

(1*R*,2*S*)-2-([[(1*R*,2*S*)-2-([(Tert-butoxy)carbonyl]amino)methyl]cyclobutyl]formamido)methyl cyclobutane-1-carboxylic acid (+)-174****



Solid LiOH (0.041 g, 1.70 mmol, 10 eq) was added to a solution of dipeptide **(-)-170** (0.060 g, 0.17 mmol) in THF (2.5 mL) and distilled water (2.5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 48 h. After evaporation of THF under reduced pressure, the solution was acidified with an aqueous solution of HCl (0.5 M) until pH = 1, saturated with solid NaCl. The aqueous resulting layer was extracted with CH₂Cl₂ (6 × 10 mL), and the combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography using a gradient of EtOAc / EP (20:80 to 100:0) as eluent to afford **(+)-174** as a white solid (0.032 g, 0.09 mmol).

Yield: 55 %.

TLC R_f (EtOAc / EP 1:1): 0.17.

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ = 1.42 (s, 9H, H-9), 1.45-1.77 (m, 1H, H-4, 1H, H-15), 1.95-2.21 (m, 1H, H-3, 1H, H-4, 1H, H-15, 1H, H-16), 2.26-2.51 (m, 1H, H-3, 1H, H-16), 2.67-2.96 (m, 1H, H-1, 1H, H-2, 1H, H-13), 3.04-3.47 (m, 1H, H-14, 2H, H-5, 2H, H-12), 5.25 (bs, 0.58H, H-6), 5.71 (bs, 0.42H, H-6), 5.89 (bs, 0.40H, H-11), 6.07 (bs, 0.60H, H-11).

¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃): δ = 22.1, 22.2, 22.3, 22.4, (C-3, C-4, C-15, C-16), 28.3 (C-9), 37.0, 37.1 (C-2, C-13), 37.5 (C-12), 38.1, 39.9 (C-1, C-14), 41.7 (C-5), 79.6 (C-8), 156.6 (C-7), 173.2 (C-10), 176.4 (C-17).

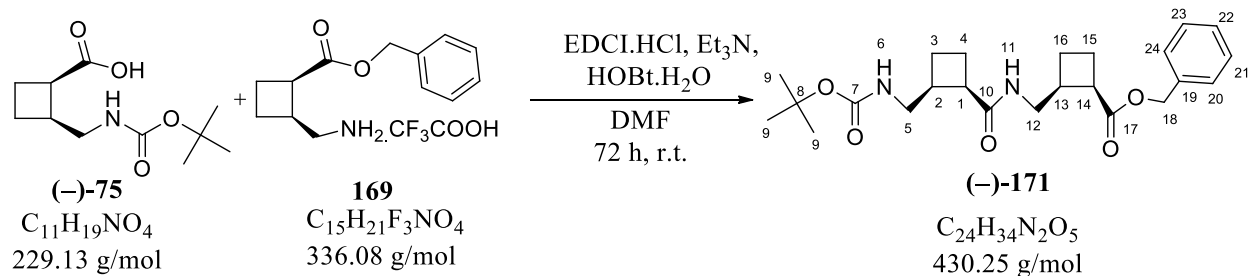
[α]_D²⁴ (C = 1,00; CHCl₃): 4.1.

MP: 193 °C.

IR (solid): (C-C, C-N) 1171, (C-O) 1219, (C=O, C=C) 1546, (C=O) 1650, (C=O) 1687, (C-H) 2947, (N-H, O-H) 3278 and 3304 cm⁻¹.

HR-MS: m/z calcd for [C₁₇H₂₈N₂O₅+Na]⁺ 363.1890 ; found 363.1873 (+ 4.9 ppm).

Benzyl (1*R*,2*S*)-2-([(1*R*,2*S*)-2-([(*tert*-butoxy) carbonyl] amino) methyl) cyclobutyl] formamido) methyl)cyclobutane-1-carboxylate (–)-171****



The TFA salt **169** (114.240 g, 0.34 mmol) was dissolved in DMF (200 μ L) and neutralized with Et₃N (282 μ L, 2.04 mmol, 6 eq) until basic medium. In another flask, EDCI.HCl (0.097 g, 0.51 mmol, 1.5 eq), HOBT.H₂O (0.054 g, 0.40 mmol, 1.18 eq) and Et₃N (94 μ L, 0.68 mmol, 2 eq) were added to a solution of (–)-**75** (0.077g, 0.34 mmol) in DMF (4 mL) at room temperature. This mixture was stirred for 10 min, and the neutralized **169** was directly introduced in this solution and the stirring was maintained 72 h at room temperature. DMF was evaporated under reduced pressure. EtOAc (10 mL) was then added, and the remaining solution was washed with citric acid 5 % (5 mL), then with saturated aqueous solution of NaHCO₃ (5 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography using a gradient of EtOAc/EP (10:90 to 100:0) as eluent to afford (–)-**171** as a white solid (0.047 g, 0.11 mmol).

Yield: 32 %.

TLC Rf (EtOAc / EP 1:1): 0.42.

¹H NMR (360 MHz, C₆D₆): δ = 1.58 (s, 9H, H-9), 1.65-1.87 (m, 2H, H-4, 2H, H-15, 1H, H-3, 1H, H-16), 2.29-2.39 (m, 1H, H-16, 1H, H-3), 2.56-2.73 (m, 1H, H-13, 1H, H-1, 1H, H-2), 3.00-3.07 (m, 1H, H-14), 3.18-3.26 (m, 1H, H-12), 3.45-3.57 (m, 1H, H-12, 2H, H-5), 5.08 (dd, J = 12 Hz, J = 40 Hz, 2H, H-18), 5.71 (t, J = 5.5 Hz, 1H, H-11), 5.64 (t, J = 5.5 Hz, 1H, H-6), 7.19-7.34 (m, 5H, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24).

¹³C NMR (90 MHz, C₆D₆): δ = 21.0 (C-16), 21.4 (C-3), 22.1 (C-4), 22.6 (C-15), 28.4 (C-9), 37.6 (C-13), 38.1 (C-2), 40.2 (C-14), 40.8 (C-12), 41.6 (C-1), 42.1 (C-5), 66.2 (C-18), 78.1 (C-8), 128.4 (C-22), 128.7 (C-20, C-21, C-23, C-24), 136.2 (C-19), 156.0 (C-7), 172.5 (C-10), 173.6 (C-17).

$[\alpha]_D^{23}$ (C = 1,00; CHCl₃): -30.

MP: 120 °C.

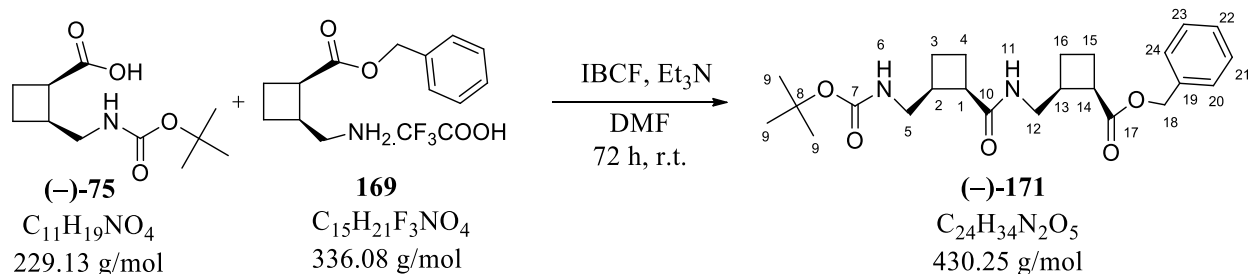
IR (solution in CHCl₃, 20 mM): (C=O) 1657, (C=O) 1708, (C-H) 2930, (N-H) 3449 cm⁻¹

IR (solid): (C-C, C-N) 1164, (C-O) 1251, (C=O, C=C) 1534, (C=O) 1649, (C=O) 1687, (C=O) 1727, (C-H) 2941, (N-H) 3316 cm⁻¹.

HR- MS: m/z calcd for [C₂₄H₃₄N₂O₅+Na]⁺ 453.2365 ; found 453.2360 (- 1.1 ppm).

Anal: calcd for C₂₄H₃₄N₂O₅: C, 66.23; H, 8.03; N, 8.58; found: C, 66.58; H, 8.23; N, 6.54.

Benzyl (1*R*,2*S*)-2-([(1*R*,2*S*)-2-([(*tert*-butoxy) carbonyl] amino) methyl) cyclobutyl] formamido) methyl)cyclobutane-1-carboxylate (–)-171****

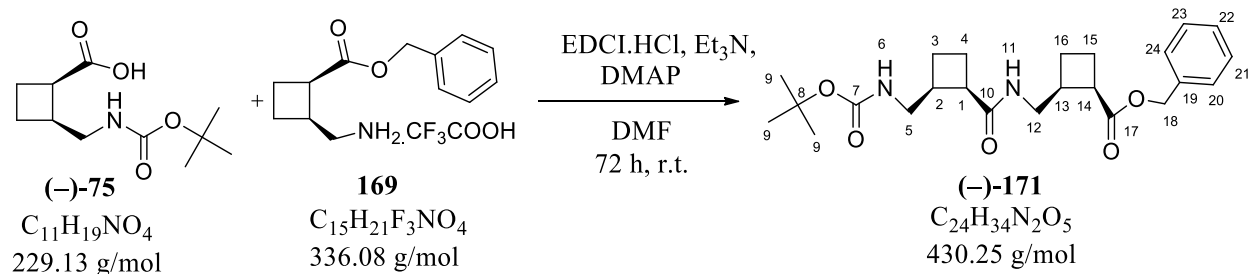


The TFA salt **169** (107.546 g, 0.32 mmol) was dissolved in DMF (1 mL) and neutralized with Et₃N (88 μL, 0.64 mmol, 2 eq) until basic medium. In another flask, IBCF (41 μL, 0.32 mmol, 1.0 eq) and Et₃N (88 μL, 0.64 mmol, 2 eq) were added to a solution of (–)-**75** (0.072g, 0.32 mmol) in DMF (1 mL) at -10 °C. This mixture was stirred for 10 min, and the reaction was allowed to reach room temperature, and the neutralized **169** was directly introduced in this solution and the stirring was maintained 72 h at room temperature. DMF was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography using a gradient of EtOAc/EP (10:90 to 100:0) as eluent to afford (–)-**171** as a white solid (0.071 g, 0.17 mmol).

Yield: 53 %.

Spectral data page 180.

Benzyl (1*R*,2*S*)-2-([(1*R*,2*S*)-2-([(*tert*-butoxy) carbonyl] amino) methyl) cyclobutyl] formamido) methyl)cyclobutane-1-carboxylate (–)-171****

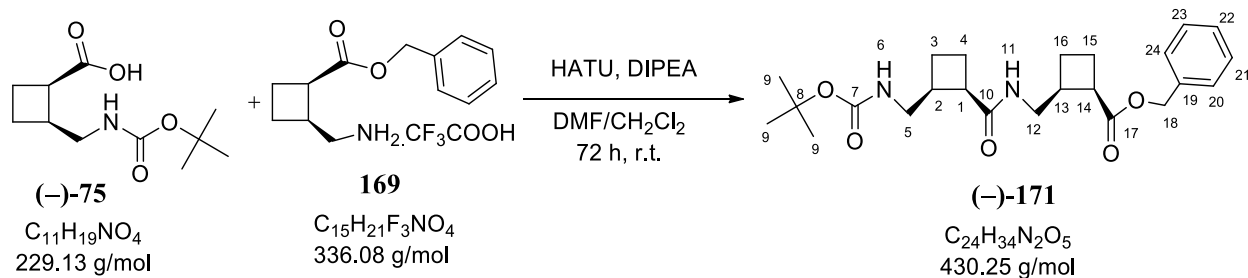


The TFA salt **169** (107.546 g, 0.32 mmol) was dissolved in DMF (1 mL) and neutralized with Et₃N (89 μL, 0.64 mmol, 2 eq) until basic medium. In another flask, EDCI.HCl (0.168 g, 0.88 mmol, 2.7 eq), DMAP (0.039 g, 0.32 mmol, 1.0 eq) and Et₃N (89 μL, 0.64 mmol, 2 eq) were added to a solution of (–)-**75** (0.074g, 0.32 mmol) in DMF (2 mL) at room temperature. This mixture was stirred for 10 min, and the neutralized **169** was directly introduced in this solution and the stirring was maintained 72 h at room temperature. DMF was evaporated under reduced pressure. EtOAc (10 mL) was then added, and the remaining solution was washed with saturated aqueous solution of KHSO₃ (0.5 M, 5 mL), then with brine (5 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography using a gradient of EtOAc/c-hexane (5:95 to 100:0) as eluent to afford (–)-**171** as a white solid (0.051 g, 0.12 mmol).

Yield: 37 %.

Spectral data page 180.

Benzyl (1*R*,2*S*)-2-([(1*R*,2*S*)-2-([(*tert*-butoxy) carbonyl] amino) methyl) cyclobutyl] formamido) methyl)cyclobutane-1-carboxylate (–)-171****

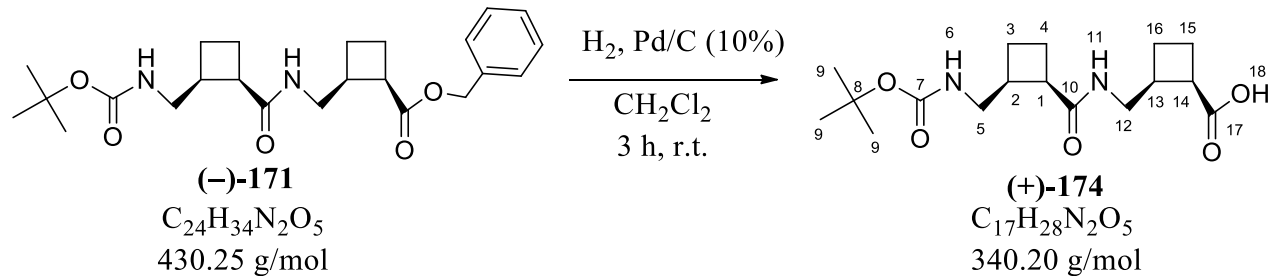


The TFA salt **169** (0.444 g, 1.32 mmol) was dissolved in a mixture of CH₂Cl₂/DMF (20:1, 15 mL) and neutralized with DIPEA (69 μ L, 3.96 mmol, 3 eq) until basic medium. In another flask, HATU (0.645 g, 1.70 mmol, 1.29 eq) and DIPEA (46 μ L, 2.64 mmol, 2 eq) were added to a solution of (–)-**75** (0.301 g, 1.32 mmol) in CH₂Cl₂/DMF (20: 1, 20 mL) at room temperature. This mixture was stirred for 10 min, and the neutralized **169** was directly introduced in this solution and the stirring maintained 72 h at room temperature. Solvents were evaporated under reduced pressure. The remaining solid was washed with water (20 mL). The crude product was purified by flash chromatography using a gradient of EtOAc/c-hexane (5:95 to 100:0) as eluent to afford (–)-**171** as a white solid (0.436 g, 1.01 mmol).

Yield: 77 %.

Spectral data page 180.

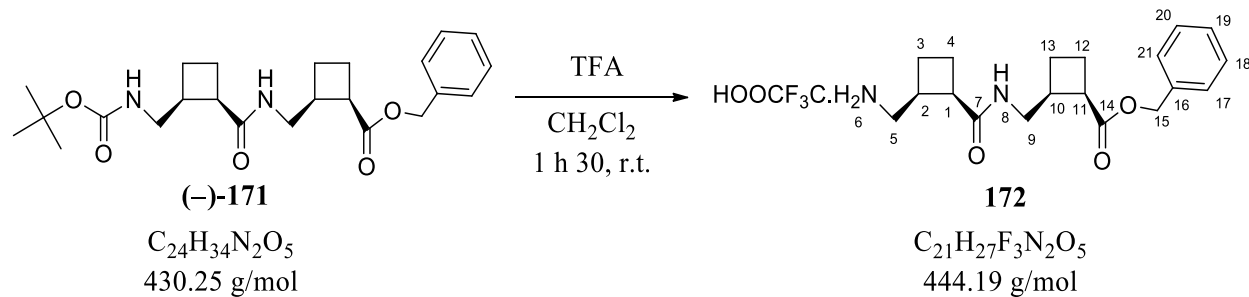
(1*R*,2*S*)-2-([[(1*R*,2*S*)-2-([[(*Tert*-butoxy) carbonyl] amino} methyl) cyclobutyl] formamido} methyl) cyclobutane-1-carboxylic acid (+)-174



To a solution of **(-)-171** (0.125 g, 0.29 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL), was added Pd on carbon (10%, 63 mg), and then the solution was purged with an hydrogen stream then under an atmosphere of hydrogen. After 3 h, the mixture was filtered on celite. Solvent was evaporated. The crude product was used in the next reaction without any purification.

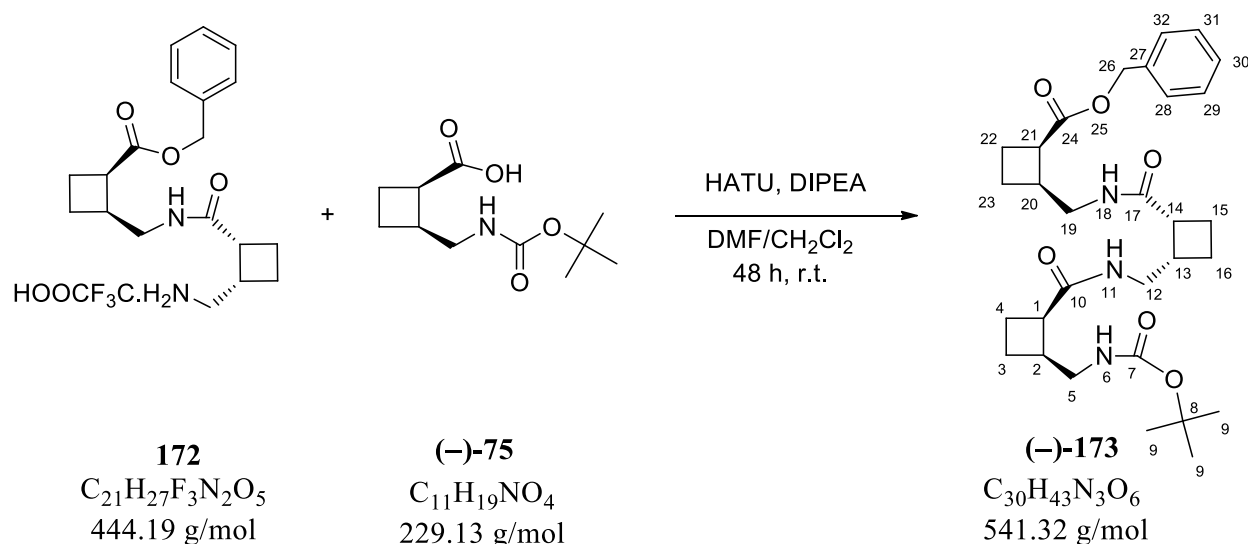
Spectral data page 179.

Benzyl (1*R*,2*S*)-2-([(1*R*,2*S*)-2-(aminomethyl)cyclobutyl]formamido)methyl)cyclobutane-1-carboxylate **172**



A solution of **(-)-171** (0.036 g, 0.084 mmol) in dry CH_2Cl_2 (3 mL) was cooled at 0 °C, and then TFA (386 μL , 5.04 mmol 60 eq) was added. The solution was stirred until completion of the deprotection within 1 h 30 at room temperature. Solvent and excess of TFA was evaporated under reduced pressure. The compound **172** was directly used in the next reaction without purification.

Benzyl (1R,2S)-2-([(1R,2S)-2-([(1R,2S)-2-([(tert-butoxy)carbonyl]amino)methyl)cyclobutyl]formamido)methyl)cyclobutyl]formamido)methyl)cyclobutane-1-carboxylate (–)-173.



The TFA salt **172** (0.103 g, 0.23 mmol) was solubilized in a mixture of CH_2Cl_2 /DMF ((20:1), 3 mL) and neutralized with DIPEA (0.46 mmol, 82 μ L, 2 eq) until basic medium. In another flask, HATU (0.114 g, 0.30 mmol, 1.29 eq) and DIPEA (0.46 mmol, 82 μ L, 2 eq) were added to a solution of (–)-**75** (0.053 g, 0.23 mmol) in CH_2Cl_2 /DMF (20: 1, 6 mL) at room temperature. This mixture was stirred for 10 min, and the neutralized **172** was directly introduced in this solution and the stirring was maintained 72 h at room temperature. DMF was evaporated under reduced pressure. The remaining solid was washed with distilled H_2O (6 mL) and Et_2O (6 mL) respectively. The crude product was purified by flash chromatography using a gradient of EtOAc / c-hexane (5:95 to 100:0) as eluent to afford (–)-**173** as a white solid (0.104 g, 0.19 mmol).

Yield: 82 %.

TLC Rf (CH_2Cl_2 / MeOH 9:1): 0.8.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.43 (s, 9H, H-9), 1.59-1.82 (m, 1H, H-15, 1H, H-4, 1H, H-23), 1.97-2.19 (m, 1H, H-3, 1H, H-4, 1H, H-15, 2H, H-16, 1H, H-22, 1H, H-23), 2.21-2.28 (m, 1H, H-3), 2.30-2.38 (m, 1H, H-22), 2.71-2.79 (m, 1H, H-2, 1H, H-13), 2.79-2.87 (m, 1H, H-20), 2.92-2.97 (m, 1H, H-14), 3.07-3.14 (m, 1H, H-1, 1H, H-21), 3.19-3.32 (m, 1H, H-5, 1H, H-12), 3.47-3.60 (m, 1H, H-12, 1H, H-19), 5.16 (dd, J = 12.6 Hz, J = 36.4 Hz, 2H, H-18), 5.44 (bs, 1H, H-6), 6.14 (bs, 1H, H-18), 6.99 (bs, 1H, H-11), 7.31-7.46 (m, 5H, H-27, H-27, H-28, H-28, H-29).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 21.3 (C-22) , 21.5 (C-3), 21.9, 22.0, 22.1, 22.7 (C-4, C-15, C-16, C-23), 28.4 (C-9), 37.7 (C-20), 37.9, 38.2 (C-2, C-13), 40.3 (C-21), 40.6 (C-19), 40.9 (C-12), 41.8 (C-14), 41.9 (C-5), 42.0 (C-15), 66.6 (C-25), 78.7 (C-8), 128.5, 128.6, 128.7 (C-27, C-28, C-29), 135.7 (C-26), 156.2 (C-7), 173.1, 173.7, 174.2 (C-10, C-17, C-24).

$[\alpha]_D^{27}$ (C = 0.98; CHCl_3): -40.

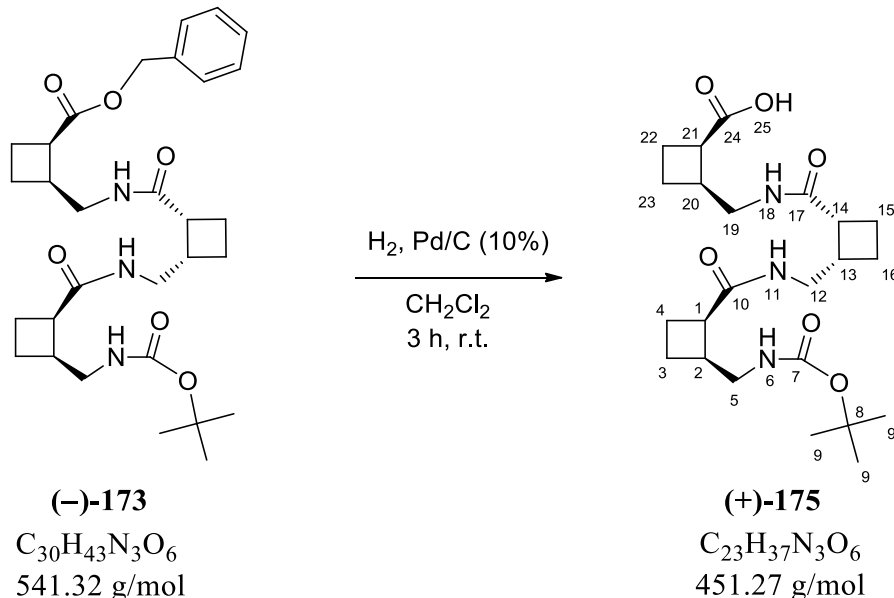
MP: 184 °C.

IR (solid): (C-C, C-N) 1173, (C-O) 1248, (C=O, C=C) 1531, (C=O) 1644, (C=O) 1686, (C=O) 1725, (C-H) 2942, (N-H) 3319 cm^{-1}

HR- MS: m/z calcd for $[\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_6+\text{Na}]^+$ 542.3225 ; found 542.3217 (1.4 ppm).

Anal: calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_6$: C, 66.52; H, 8.00; N, 7.76; found: C, 64.28; H, 8.12; N, 7.90.

(1R,2S)-2-([[(1R,2S)-2-([[(1R,2S)-2-([(tert-butoxy)carbonyl]amino)methyl]cyclobutyl]formamido)methyl]cyclobutyl]formamido)methyl]cyclobutane-1-carboxylic acid (+)-175.



To a solution of **(-)-173** (0.050 g, 0.09 mmol) in CH_2Cl_2 (6 mL), was added Pd on carbon (10%, 63 mg), and then the solution was purged with an hydrogen stream then under an atmosphere of hydrogen. After 3 h, the mixture was filtered on celite. Solvent was evaporated under reduced pressure to afford white solid (0.032 g, 0.07 mmol). The crude product was used in the next reaction without any purification.

TLC Rf (CH_2Cl_2 / MeOH 9:1): 0.4

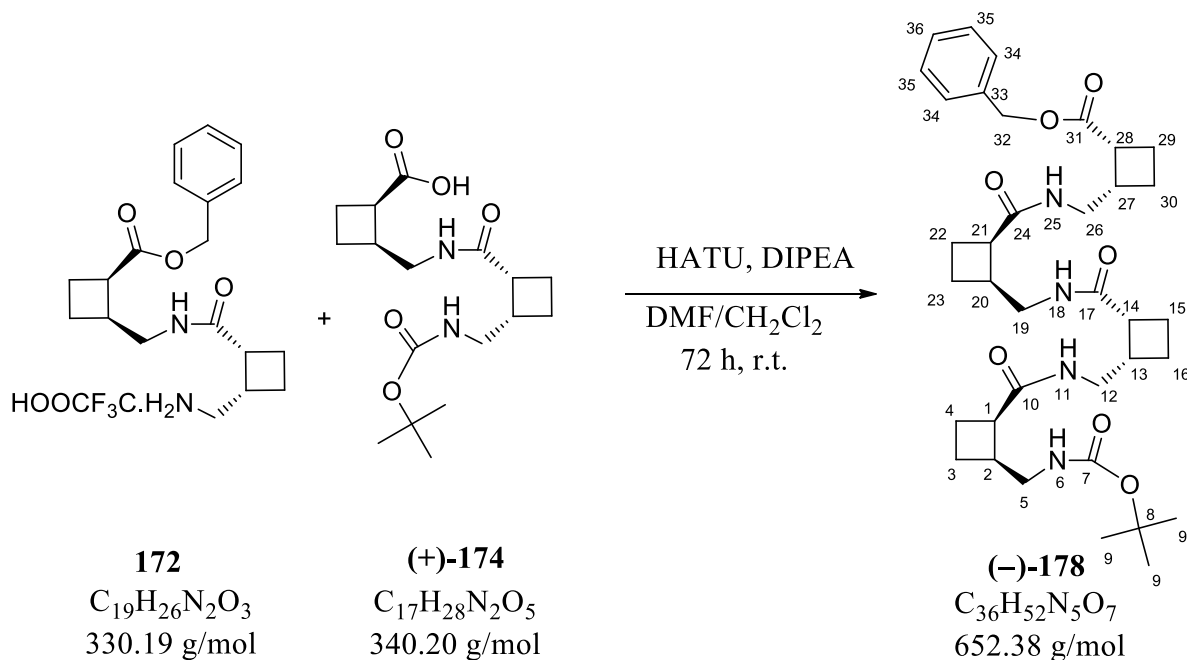
$[\alpha]_D^{26}$ (C = 1.0; MeOH): 19

MP: 225 °C.

IR (solid): (C-C, C-N) 1170, (C-O) 1250, (C=O, C=C) 1532, (C=O) 1642, (C=O) 1684, (C=O) 1720, (C-H) 2943, (N-H, O-H) 3316 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6 + \text{Na}]^+$ 474.2575 ; found 474.2562 (2.6ppm).

Benzyl (1*R*,2*S*)-2-([[(1*R*,2*S*)-2-([[(1*R*,2*S*)-2-([[(1*R*,2*S*)-2-([[(*tert*-butoxy)carbonyl]amino} methyl)cyclobutyl]formamido}methyl)cyclobutyl]formamido}methyl)cyclobutyl]formamido } methyl)cyclobutane-1-carboxylate (–)-178****



The TFA salt **172** (0.157 g, 0.35 mmol) was solubilized in a mixture of CH_2Cl_2 /DMF (20:1, 4 mL) and neutralized with DIPEA (324 μ L, 1.40 mmol, 4 eq) until basic medium. In another flask, HATU (0.173 g, 0.46 mmol, 1.29 eq) and DIPEA (162 μ L, 0.70 mmol, 2 eq) were added to a solution of **(+)-174** (0.120 g, 0.35 mmol) in CH_2Cl_2 /DMF (20:1; 5 mL) at room temperature. This mixture was stirred for 10 min, and the neutralized **172** was directly introduced in this solution and the stirring was maintained 72 h at room temperature. The solvents were concentrated. The crude product was washed with distilled H_2O and Et_2O respectively. The remaining white solid was then filtered to afford the tetrapeptide **(–)-178** (0.157 g, 0.24 mmol).

Yield: 68 %.

TLC Rf (CH_2Cl_2 / MeOH 9:1): 0.6.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.42 (s, 9H, H-9), 1.57-1.77 (m, 1H, H-4, 1H, H-15, 1H, H-23, 1H, H-29), 1.98-2.18 (m, 1H, H-3, 1H, H-4, 1H, H-15, 2H, H-16, 1H, H-22, 1H, H-23, 1H, H-29, 1H, H-30), 2.28-2.36 (m, 1H, H-3, 1H, H-22, 1H, H-30), 2.61-2.88 (m, 1H, H-2, 1H, H-13, 1H, H-27, 1H, H-20), 2.95-3.00 (m, 1H, H-14), 3.09-3.31 (m, 1H, H-1, 2H, H-5, 1H, H-12, 1H, H-19, 1H,

H-21, 1H, H-26, 1H, H-28), 3.47-3.57 (m, 1H, H-12, 1H, H-19, 1H, H-26), 5.15 (dd, $J = 12.1$ Hz, $J = 34.3$ Hz, 2H, H-18), 5.50 (bs, 1H, H-6), 6.19 (bs, 1H, H-25), 7.15 (bs, 1H, H-18), 7.24 (bs, 1H, H-11), 7.31-7.46 (m, 2H, H-34, 2H, H-35, 1H, H-36).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 21.2, 21.4, 21.7, 21.8, 21.9, 22.0, 22.5$ (C-3, C-4, C-15, C-16, C-22, C-23, C-29, C-30), 28.3 (C-9), 37.6, 37.9, 38.1 (C-2, C-13, C-20, C-27), 40.2 (C-28), 40.5, 40.7, 40.8 (C-12, C-19, C-28), 41.7, 41.8, 41.9, 42.1 (C-1, C-5, C-14, C-21), 66.4 (C-32), 78.5 (C-8), 128.3, 128.4, 128.6 (C-34, C-35, C-36), 135.7 (C-33), 156.1 (C-7), 173.1, 173.6, 174.1 (C-10, C-17, C-24, C-31).

$[\alpha]_D^{29}$ (C = 0.3; CHCl_3): - 80.

MP: 215 °C.

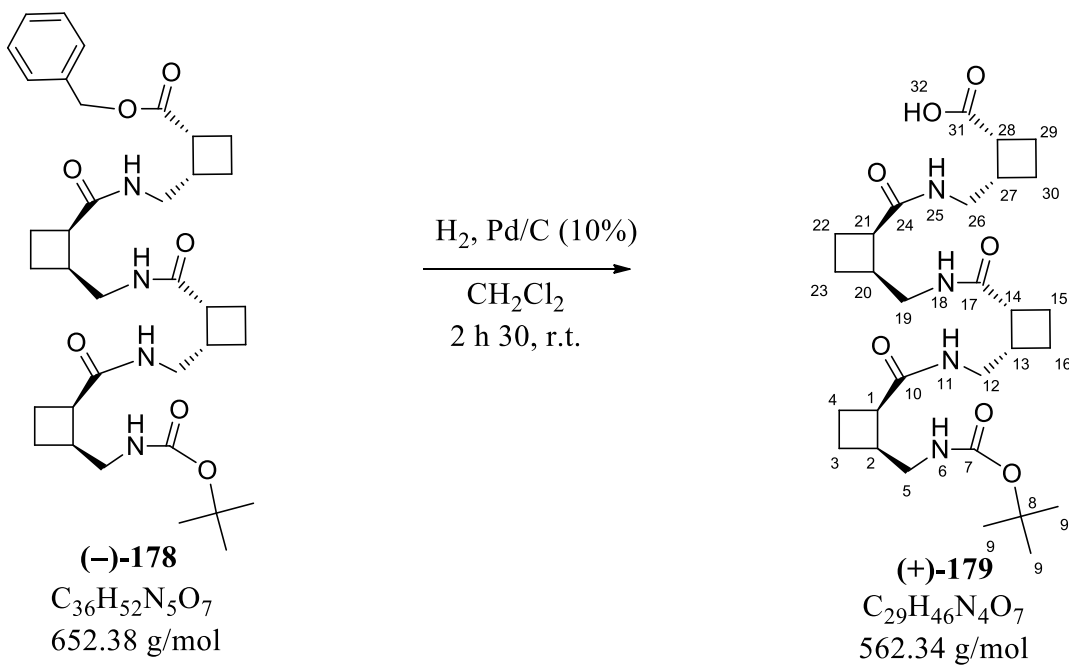
IR (solution in CHCl_3 , 20 mM): (C=O) 1648, (C=O) 1708, (C-H) 2943, (N-H) 3362, (N-H) 3443 cm^{-1} .

IR (solid): (C-C, C-N) 1174, (C-O) 1246, (C=O, C=C) 1529, (C=O) 1628, (C=O) 1644, (C=O) 1686, (C=O) 1725, (C-H) 2943, (N-H) 3319 and 3361 cm^{-1} .

HR-MS: m/z calcd for $[\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_7 + \text{Na}]^+$ 675.3728 ; found 675.3743 (- 2.1 ppm).

Anal: calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_5\text{O}_7$: C, 66.23; H, 8.03; N, 8.58; found: C, 62.67; H, 8.14; N, 8.65.

(1*R*,2*S*)-2-({[(1*R*,2*S*)-2-({[(1*R*,2*S*)-2-({[(1*R*,2*S*)-2-({[(*Tert*-butoxy)carbonyl]amino}methyl) cyclobutyl]formamido}methyl)cyclobutyl]formamido}methyl)cyclobutyl]formamido}methyl) cyclobutane-1-carboxylic acid (+)-179



To a solution of (–)-**178** (0.100 g, 0.15 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL), was added Pd on carbon (10%, 65 mg), and then the solution was purged with an hydrogen stream. After 2 h 30, the mixture was filtered on celite and eluted with MeOH. Solvents were evaporated to afford white solid (0.084 g, 0.15 mmol). The crude product was used for analysis and gelation tests without any purification.

TLC Rf (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1): 0.31.

$$[\alpha]_D^{26} (C = 0.83; \text{MeOH}): 23$$

MP: 215 °C.

IR (solid): (C-C, C-N) 1170, (C-O) 1249, (C=O, C=C) 1532, (C=O) 1645, (C=O) 1687, (C=O) 1726, (C-H) 2941, (N-H, O-H) 3317 cm⁻¹.

HR-MS: m/z calcd for [C₂₉H₄₆N₄O₇+Na]⁺ 585.3259 ; found 585.3238 (3.5 ppm).

172
 $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$
 330.19 g/mol

(+)-179
 $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_7$
 562.34 g/mol

(-)-180
 $\text{C}_{48}\text{H}_{70}\text{N}_6\text{O}_9$
 874.52 g/mol

Reaction conditions: HATU, DIPEA, DMF, 7 days, r.t.

TLC Rf (CH₂Cl₂ / MeOH 9:1): 0.6.

208

References

- (1) Eugene, R.; Sam, F. *J. Biol. Chem.* **1950**, *187*, 55.
- (2) Boistel, J.; Fatt, P. *J. Physiol.* **1958**, *144*, 176.
- (3) Gajcy, K.; Lochynski, S.; Librowski, T. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2338.
- (4) Yoshimura, M.; Toyoshi, T.; Sano, A.; Izumi, T.; Fujii, T.; Konishi, C.; Inai, S.; Matsukura, C.; Fukuda, N.; Ezura, H.; Obata, A. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 615.
- (5) Chuang, C.-Y.; Shi, Y.-C.; You, H.-P.; Lo, Y.-H.; Pan, T.-M. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3027.
- (6) Clift, M. D.; Ji, H.; Deniau, G. P.; O'Hagan, D.; Silverman, R. B. *Biochemistry (Mosc.)* **2007**, *46*, 13819.
- (7) Levandovskiy, I. A.; Sharapa, D. I.; Shamota, T. V.; Rodionov, V. N.; Shubina, T. E. *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 223.
- (8) Kuriyama, K.; Sze, P. Y. *Neuropharmacology* **1971**, *10*, 103.
- (9) Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 567.
- (10) Macdonald, R. L. *Annu. Rev. Neurosci.* **1994**, *17*, 569.
- (11) Kerr, D. I. B.; Ong, J. *Pharmacology Ther.* **1995**, *67*, 187.
- (12) Krogsgaard-Larsen, P.; Johnston, G. A. R.; Curtis, D. R.; Game, C. J. A.; McCulloch, R. M. *J. Neurochem.* **1975**, *25*, 803.
- (13) Nicholson, S. H.; Suckling, C. J. *J. Neurochem.* **1978**, *32*, 249.
- (14) Johnston, G. A. R.; Curtis, D. R.; Beart, P. M.; Game, C. J. A.; McCulloch, R. M.; Twitchin, B. *J. Neurochem.* **1975**, *24*, 157.
- (15) Bryans, J. S.; Wustrow, D. J. *Med. Res. Rev.* **19**, 149.
- (16) Krogsgaard-Larsen, P.; Johnston, G. A. R.; Lodge, D.; Curtis, D. R. *Nature* **1977**, *268*, 53.
- (17) Drew, C. A.; Johnston, G. A. R.; Weatherby, R. P. *Neurosci. Lett.* **1984**, *52*, 317.
- (18) Krogsgaard-Larsen, P.; Schaumburg, K. *Acta Chem. Scand. B* **1981**, *35*, 311.
- (19) Filip, M.; Frankowska, M. *Pharmacol. Rep.* **2008**, *60*, 755.
- (20) Taylor, C. P.; Vartanian, M. G.; Yuen, P.-W.; Bigge, C.; Suman-Chauhan, N.; Hill, D. R. *Epilepsy Res.* **1993**, *14*, 11.
- (21) Vasudev, P. G.; Chatterjee, S.; Shamala, N.; Balaram, P. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1628.
- (22) Goa, K. L.; Sorkin, E. M. *drugs* **1993**, *46*, 409.
- (23) Dworkin, R. H.; Kirkpatrick, P. *Nat. Rev.* **2005**, *4*, 455.
- (24) Jung, M. J.; Lippert, B. W.; Metcale, B. W.; Böhlen, P.; Schechter, P. J. *J. Neurochem.* **1977**, *29*, 797.
- (25) Donald Shields, W.; Sankar, R. *Semin. Pediatr. Neurol.* **1997**, *4*, 43.
- (26) Ordóñez, M.; Cativiela, C. *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, *18*, 3.
- (27) Kuo, J.-H.; Wong, W.-C. Method for preparing chiral baclofen. US 2012/0029230, September 2012.
- (28) Huckabee, B. K.; Denis M. Sobieray. Methods of Making (S)-3-(Aminomethyl)-5-Methylhexanoic Acid. US Patent 5,629,447, May 13, 1997.
- (29) Grote, T. M.; Huckabee, B. K.; Mulhern, T.; Sobieray, D. M.; Titus, R. D. Methods of Making (S)-3-(Aminomethyl)-5-Methylhexanoic Acid. US Patent 6,046,353, April 4, 2000.
- (30) Burk, M. J.; Goel, O.; Hoekstra, M. S.; Mich, T. F.; Mulhern, T.; Ramsden, J. A. Asymmetric Synthesis of Pregabalin. US 2003/0212290 A1, November 13, 2003.
- (31) Duclos, M.-C. Process for Preparing 4-Amino-5-hexanoic Acid From Succinimide. EP 2 537 827 A1, December 26, 2012.
- (32) Yeung; Hong, S.; Corey, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6310.

- (33) Mita, T.; Fukuda, N.; Roca, F. X.; Kanai, M.; Shibasaki, M. *Org. Lett.* **2007**, 9, 259.
- (34) Yamatsugu, K.; Kamijo, S.; Suto, Y.; Kanai, M.; Shibasaki, M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 1403.
- (35) Trost, B. M.; Zhang, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3759.
- (36) Pan, Y.; Gerasimov, M. R.; Kvist, T.; Wellendorph, P.; Madsen, K. K.; Pera, E.; Lee, H.; Schousboe, A.; Chebib, M.; Bräuner-Osborne, H.; Craft, C. M.; Brodie, J. D.; Schiffer, W. K.; Dewey, S. L.; Miller, S. R.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 357.
- (37) Silverman, R. B.; Pan, Y. Compounds and Related Methods For Inhibition of γ -minobutyric Acid Aminotransferase. US 6,794,413 B1, September 21, 2004.
- (38) Hill, R. C.; Maurer, R.; Buescher, H.-H.; Roemer, D. *Eur. J. Pharmacol.* **1981**, 69, 221.
- (39) Duke, R. K.; Chebib, M.; Balcar, V. J.; Allan, R. D.; Mewett, K. N.; Johnston, G. A. R. *J. Neurochem.* **2000**, 75, 2602.
- (40) Morikawa, T.; Sesaki, H.; Hanai, R.; Shibuya, A.; Taguchi, T. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 97.
- (41) Mohapatra, D. K. *Synth. Commun.* **1999**, 29, 4261.
- (42) Rodríguez-Soria, V.; Quintero, L.; Sartillo-Piscil, F. *Tetrahedron* **2008**, 64, 2750.
- (43) Baxendale, I. R.; Ernst, M.; Krahner, W.-R.; Ley, S. V. *Synlett* **2002**, 10, 1641.
- (44) Aitken, D. J.; Drouin, L.; Goretta, S.; Guillot, R.; Ollivier, J.; Spiga, M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 7517.
- (45) Nakada, K.; Yoshikawa, M.; Ide, S.; Suemasa, A.; Kawamura, S.; Kobayashi, T.; Masuda, E.; Ito, Y.; Hayakawa, W.; Katayama, T.; Yamada, S.; Arisawa, M.; Minami, M.; Shuto, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 4938.
- (46) Kennewell, P. D.; Matharu, S. S.; Taylor, J. B.; Westwood, R.; Sammes, P. G. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1982**, 2553.
- (47) Kennewell, P. D.; Matharu, S. S.; Taylor, J. B.; Westwood, R.; Sammes, P. G. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1982**, 2563.
- (48) Gassman, P. G.; Mansfield, K. T. *J. Org. Chem.* **1967**, 32, 915.
- (49) Galeazzi, R.; Mobbili, G.; Orena, M. *Tetrahedron* **1999**, 55, 261.
- (50) André, V.; Vidal, A.; Ollivier, J.; Robin, S.; Aitken, D. J. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 1253.
- (51) André, V.; Gras, M.; Awada, H.; Guillot, R.; Robin, S.; Aitken, D. J. *Tetrahedron* **2013**, 69, 3571.
- (52) Allan, R. D.; Curtis, D. R.; Headley, P. M.; Johnston, G. A. R.; Kennedy, S. M. E.; Lodge, D.; Twitchin, B. *Neurochem. Res.* **1980**, 5, 394.
- (53) Avram, M.; Nenitzescu, C. D.; Maxim, M. *Chem. Ber.* **1957**, 90, 1424.
- (54) Burgess, K.; Li, S.; Rebenspies, J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1681.
- (55) Giuliano, M. W.; Maynard, S. J.; Almeida, A. M.; Reidenbach, A. G.; Guo, L.; Ulrich, E. C.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 12351.
- (56) Kelly, H. A.; Bolton, R.; Brown, S. A.; Coote, S. J.; Dowle, M.; Dyer, U.; Finch, H.; Golding, D.; Lowdon, A.; McLaren, J.; Montana, J. G.; Owen, M. R.; Pegg, N. A.; Ross, B. C.; Thomas, R.; Walker, D. A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6979.
- (57) Omar, F.; Frahm, A. W. *Asymmetrische Reduktive Aminierung* **1989**, 322, 461.
- (58) Rodríguez-Vázquez, N.; Salzinger, S.; Silva, L. F.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2013, 3477.
- (59) Guo, L.; Zhang, W.; Guzei, I. A.; Spencer, L. C.; Gellman, S. H. *Org. Lett.* **2012**, 14, 2582.
- (60) Guo, L.; Chi, Y.; Almeida, A. M.; Guzei, I. A.; Parker, B. K.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 16018.
- (61) Hanby, W. E.; Rydon, H. N. *Biochem. J.* **1946**, 40, 297.
- (62) Laatsch, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1982**, 1982, 28.
- (63) Hunter, L.; Chung, J. H. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 5502.

- (64) Fusetani, N.; Matsunaga, S.; Matsumoto, H.; Takebayashi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7053.
- (65) Bewley, C. A.; Faulkner, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2162.
- (66) Nakao, Y.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1115.
- (67) Seebach, D.; Matthews, J. L. *Chem. Commun.* **1997**, 2015.
- (68) Seebach, D.; Gardiner, J. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1366.
- (69) Frackenpohl, J.; Arvidsson, P. I.; Schreiber, J. V.; Seebach, D. *Chembiochem* **2001**, *2*, 445.
- (70) Sven, H.; Tuping, Z.; Tomas, O. *Acta Crystallogr. Sect. E* **2002**, *58*, 768.
- (71) Chatterjee, S.; Roy, R. S.; Balaram, P. *J. R. Soc. Interface* **2007**, *4*, 587.
- (72) Seebach, D.; Beck, A. K.; Bierbaum, D. J. *Chem. Biodivers.* **2004**, *1*, 1111.
- (73) Brenner, M.; Seebach, D. *Helvetica Chem. Acta* **2001**, *84*, 2155.
- (74) Seebach, D.; Schaeffer, L.; Brenner, M.; Hoyer, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 776.
- (75) Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R.; Michnick, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8569.
- (76) Hintermann, T.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D. *Helvetica Chem. Acta* **1998**, *81*, 983.
- (77) Baldauf, C.; Günther, R.; Hofmann, H.-J. *Helvetica Chem. Acta* **2003**, *86*, 2573.
- (78) Sharma, G. V. M.; Jayaprakash, P.; Narsimulu, K.; Ravi Sankar, A.; Ravinder Reddy, K.; Radha Krishna, P.; Kunwar, A. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2944.
- (79) Van Well, R. M.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M.; Vang Carstenen, E.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9331.
- (80) Vasudev, P. G.; Shamala, N.; Ananda, K.; Balaram, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4972.
- (81) Guo, L.; Zhang, W.; Reidenbach, A. G.; Giuliano, M. W.; Guzei, I. A.; Spencer, L. C.; Gellman, S. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5843.
- (82) Woll, M. G.; Lai, J. R.; Guzei, I. A.; Taylor, S. J. C.; Smith, M. E. B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11077.
- (83) Farrera-Sinfreu, J.; Zaccaro, L.; Vidal, D.; Salvatella, X.; Giralt, E.; Pons, M.; Albericio, F.; Royo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6048.
- (84) Kothari, A.; Qureshi, M. K. N.; Beck, E. M.; Smith, M. D. *Chem. Commun.* **2007**, 2814.
- (85) Edwards, A. A.; Sanjayan, G. J.; Hachisu, S.; Tranter, G. E.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 7718.
- (86) Aguilera, J.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron Asymmetry* **2008**, *19*, 302.
- (87) Gutiérrez-Abad, R.; Carbajo, D.; Nolis, P.; Acosta-Silva, C.; Cobos, J. A.; Illa, O.; Royo, M.; Ortuño, R. M. *Amino Acids* **2011**, *41*, 673.
- (88) Gorrea, E.; Carbajo, D.; Gutiérrez-Abad, R.; Illa, O.; Branchadell, V.; Royo, M.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4050.
- (89) Qureshi, M. K. N.; Smith, M. D. *Chem. Commun.* **2006**, 5006.
- (90) Jones, C. R.; Qureshi, M. K. N.; Truscott, F. R.; Hsu, S.-T. D.; Morrison, A. J.; Smith, M. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7099.
- (91) Declerck, V.; Aitken, D. J. *Amino Acids* **2011**, *41*, 587.
- (92) Ninomiya, I.; Naito, T. *Photochemical Synthesis*; Academic Press, 2012.
- (93) Podlech, J.; Seebach, D. *Liebigs Ann.* **1995**, 1217.
- (94) Guibourdenche, C.; Podlech, J.; Seebach, D. *Liebigs Ann.* **1996**, 1121.
- (95) D'Auria, M. V.; Sepe, V.; D'Orsi, R.; Bellotta, F.; Debitus, C.; Zampella, A. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 131.
- (96) Sharma, G. V. M.; Jadhav, V. B.; Ramakrishna, K. V. S.; Jayaprakash, P.; Narsimulu, K.; Subash, V.; Kunwar, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14657.
- (97) Ko, S. Y. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2689.
- (98) Cesar, J.; Dolenc, M. S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7099.
- (99) Aoyama, T.; Shioiri, T. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 4461.

- (100) Wasserman, H. H.; Ho, W.-B. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4364.
- (101) Gu, X.; Xian, M.; Roy-Faure, S.; Bolte, J.; Aitken, D. J.; Gefflaut, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 193.
- (102) Faure, S.; Jensen, A. A.; Maurat, V.; Gu, X.; Sagot, E.; Aitken, D. J.; Bolte, J.; Gefflaut, T.; Bunch, L. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6532.
- (103) Kai, K.; Horita, J.; Wakasa, K.; Miyagawa, H. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1651.
- (104) Nielsen, L.; Brehem, L.; Krogsgaard-Larsen, P. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 71.
- (105) Garvey, D. S.; May, P. D.; Nadzan, A. M. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 936.
- (106) Fernandes, C.; Gauzy, C.; Yang, Y.; Roy, O.; Pereira, E.; Faure, S.; Aitken, D. J. *Synthesis* **2007**, *14*, 2222.
- (107) Hou, D.-R.; Reibenspies, J. H.; Burgess, K. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 206.
- (108) Caputo, R.; Longobardo, L. *Amino Acids* **2007**, *32*, 401.
- (109) Agami, C.; Couty, F. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2701.
- (110) Roggen, H.; Kehler, J.; Stensbøl, T. B.; Hansen, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2834.
- (111) DeVita, R. J.; Goulet, M. T.; Wyvratt, M. J.; Fisher, M. H.; Lo, J.-L.; Yang, Y. T.; Cheng, K.; Smith, R. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2621.
- (112) Aitken, D. J.; Gordier-Marc, E.; Husson, H.-P. *Nat. Prod. Lett.* **1999**, *13*, 263.
- (113) Constantino, M. G.; de Oliveira, K. T.; Polo, E. C.; da Silva, G. V. J.; Brocksom, T. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9880.
- (114) Ferreira da Costa, J.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Midón, P.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6797.
- (115) Huck, B. R.; Gellman, S. H. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3353.
- (116) Mayans, E.; Gargallo, A.; Álvarez-Larena, Á.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 1425.
- (117) Usami, K.; Isobe, M. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12061.
- (118) Hyvönen, M. T.; Keinänen, T. A.; Khomutov, M.; Simonian, A.; Weisell, J.; Kochetkov, S. N.; Vepsäläinen, J.; Alhonen, L.; Khomutov, A. R. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4611.
- (119) Chi, Y.; Gellman, S. H. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4253.
- (120) Almiento, G. M.; Balducci, D.; Bottoni, A.; Calvaresi, M.; Porzi, G. *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, *18*, 2695.
- (121) Wineman, R. J.; Hsu, E.-P. T.; Anagnostopoulos, C. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6233.
- (122) Franzisket, L.; Heesing, A. *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 635.
- (123) Chapman, O. L.; Hoganson, E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 498.
- (124) Kennedy, J. W. J.; Hall, D. G. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4412.
- (125) Amadji, M.; Vadecard, J.; Plaquevent, J.-C.; Duhamel, L.; Duhamel, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12483.
- (126) Gerona-Navarro, G.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3953.
- (127) Bégis, G.; Cladingboel, D. E.; Jerome, L.; Motherwell, W. B.; Sheppard, T. D. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 1532.
- (128) Awada, H.; Robin, S.; Guillot, R.; Yazbeck, O.; Naoufal, D.; Jaber, N.; Hachem, A.; Aitken, D. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *xx*, xxxx.
- (129) Barbayianni, E.; Fotakopoulou, I.; Schmidt, M.; Constantinou-Kokotou, V.; Bornscheuer, U. T.; Kokotos, G. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8730.
- (130) Fernandes, C.; Faure, S.; Pereira, E.; Théry, V.; Declerck, V.; Guillot, R.; Aitken, D. J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3606.
- (131) Celis, S.; Gorrea, E.; Nolis, P.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 861.

- (132) Thétiot-Laurent, S.; Bouillère, F.; Baltaze, J.-P.; Brisset, F.; Feytens, D.; Kouklovsky, C.; Miclet, E.; Alezra, V. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9660.
- (133) Aravinda, S.; Ananda, K.; Shamala, N.; Balaram, P. *Chem. - Eur. J.* **2003**, *9*, 4789.
- (134) Vasudev, P. G.; Ananda, K.; Chatterjee, S.; Aravinda, S.; Shamala, N.; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4039.
- (135) Pelton, J. T.; McLean, L. R. *Anal. Biochem.* **2000**, *277*, 167.
- (136) Fülöp, F.; Martinek, T. A.; Tóth, G. K. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 323.
- (137) Hamley, I. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8128.
- (138) Rúa, F.; Boussert, S.; Parella, T.; Díez-Pérez, I.; Branchadell, V.; Giralt, E.; Ortuño, R. M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3643.
- (139) Celis, S.; Nolis, P.; Illa, O.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2839.
- (140) Pelton, J. T.; McLean, L. R. *Anal. Biochem.* **2000**, *277*, 167.
- (141) Seifriz, W. *Bot. Rev.* **1945**, *11*, 231.
- (142) Ottani, V.; Raspanti, M.; Ruggeri, A. *Micron* **2001**, *32*, 251.
- (143) Clark, A. H.; Ross-Murphy, S. B. *Adv. Polym. Sci.* **1987**, *83*, 57.
- (144) Wu, B.; Mu, C.; Zhang, G.; Lin, W. *Langmuir* **2009**, *25*, 11905.
- (145) Zhou, J.; Zhou, M.; Caruso, R. A. *Langmuir* **2006**, *22*, 3332.
- (146) Tomasini, C.; Castellucci, N. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 156.
- (147) Dastidar, P. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2699.
- (148) Terech, P.; Weiss, R. G. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3133.
- (149) Estroff, L. A.; Hamilton, A. D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1201.
- (150) Castellucci, N.; Falini, G.; Angelici, G.; Tomasini, C. *Amino Acids* **2011**, *41*, 609.
- (151) Jung, J. P.; Gasiorowski, J. Z.; Collier, J. H. *Biopolymers* **2010**, *94*, 49.
- (152) Escuder, B.; Rodríguez-Llansola, F.; Miravet, J. F. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 1044.
- (153) Wicklein, A.; Ghosh, S.; Sommer, M.; Würthner, F.; Thelakkat, M. *ACS Nano* **2009**, *3*, 1107.
- (154) Hirst, A. R.; Escuder, B.; Miravet, J. F.; Smith, D. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8002.
- (155) Zhang, S.; Holmes, T.; Lockshin, C.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 3334.
- (156) Semino, C. E. *J. Dent. Res.* **2008**, *87*, 606.
- (157) Segers, V.; Lee, R. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 561.
- (158) Davis, M. E.; Hsieh, P. C. H.; Takahashi, T.; Song, Q.; Zhang, S.; Kamm, R. D.; Grodzinsky, A. J.; Anversa, P.; Lee, R. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 8155.
- (159) Yang, Z.; Xu, K.; Wang, L.; Gu, H.; Wei, H.; Zhang, M.; Xu, B. *Chem. Commun.* **2005**, 4414.
- (160) Tanaka, K.; Mori, A.; Inoue, S. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 181.
- (161) Guler, M. O.; Stupp, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12082.
- (162) Castellucci, N.; Sartor, G.; Calonghi, N.; Parolin, C.; Falini, G.; Tomasini, C. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 417.
- (163) Maiti, D. K.; Banerjee, A. *Chem. - Asian J.* **2013**, *8*, 113.
- (164) Martinek, T. A.; Hetényi, A.; Fülöp, L.; Mándity, I. M.; Tóth, G. K.; Dékány, I.; Fülöp, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2396.
- (165) Torres, E.; Gorrea, E.; Burusco, K. K.; Da Silva, E.; Nolis, P.; Rúa, F.; Boussert, S.; Díez-Pérez, I.; Dannenberg, S.; Izquierdo, S.; Giralt, E.; Jaime, C.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 564.
- (166) Gorrea, E.; Nolis, P.; Torres, E.; Da Silva, E.; Amabilino, D. B.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 4588.
- (167) Jadhav, S. V.; Gopi, H. N. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9179.

- (168) De Loos, M.; van Esch, J. H.; Kellogg, R. M.; Feringa, B. L. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7285.
- (169) Iqbal, S.; Miravet, J. F.; Escuder, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008, 4580.
- (170) Curcio, P.; Allix, F.; Pickaert, G.; Jamart-Grégoire, B. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 13603.
- (171) Jaime-Figueroa, S.; Zamilpa, A.; Guzmán, A.; Morgans, D. J. *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 3739.
- (172) Grimm, J. B.; Stables, J. P.; Brown, M. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4133.
- (173) Alves, J. C. F. *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 855.